

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Óptica con orientación en Optoelectrónica**

**Espectroscopía Raman coherente utilizando pulsos de femto-
segundos y chirp lineal**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Giovanni Guzmán Santiago

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por
Giovanni Guzmán Santiago

Y aprobada por el comité

Dr. Israel Rocha Mendoza
Director de tesis

Dra. Karina Garay Palmett
Dr. Santiago Camacho López
Dr. Víctor Manuel Coello Cárdenas
Dra. Patricia Juárez Camacho



Dr. Pedro Negrete Regagnon
Coordinador del Posgrado de Óptica

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Giovanni Guzmán Santiago** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Óptica con orientación en Optoelectrónica.

Espectroscopía Raman coherente utilizando pulsos de femto-segundos y chirp lineal

Resumen aprobado por

Dr. Israel Rocha Mendoza
Director de tesis

La biofotónica es un área de investigación relativamente nueva que en tan solo dos décadas ha tenido un gran progreso tecnológico con la introducción de nuevas técnicas de imagen con potencial aplicación en microbiología y biomedicina. Particularmente para el estudio y la manipulación de sistemas microscópicos tales como las macro-moléculas, las células y el tejido biológico. Dicho progreso tecnológico incluye la innovación o mejoramiento de técnicas ya existentes tales como la espectroscopía Raman, la cual es una herramienta bastante consolidada y útil para investigaciones en química de gases y estado sólido, por su capacidad de extraer información espectral molecular de manera no destructiva y no invasiva. Trasladar dichas características del efecto Raman a un sistema biológico *in vivo* ha sido tema de investigación por lo menos las últimas dos décadas. A diferencia de la microscopía confocal, con el efecto Raman se puede estudiar la conformación molecular sin necesidad de utilizar marcadores fluorescentes. Sin embargo, la física del efecto Raman ocurre de forma espontánea lo cual la hace muy ineficiente, requiriendo tiempos de integración largos para adquirir la información espectral en un solo punto, o bien una excitación muy intensa por encima del umbral de daño de cualquier sistema biológico. Esto hace imposible tomar imágenes rápidas en cualquier sistema biológico vivo. Para mejorar la eficiencia del proceso Raman se ha recurrido al uso de la óptica no lineal en la cual se emplean pulsos ultracortos para inducir de forma coherente (no espontánea) efectos Raman no lineales. Procesos Raman no lineales como el esparcimiento Raman Estimulado (SRS) y esparcimiento anti-Stokes Raman Coherente (CARS), han sido implementados con gran éxito para la obtención rápida de imágenes Raman. La presente tesis describe un trabajo experimental que tiene como objeto construir un sistema óptico para realizar espectroscopía vibracional Raman basados en los procesos ópticos no-lineales SRS y CARS, utilizando una fuente de pulsos láser ultracortos de femto-segundos y *chirp* lineal. Para demostrar la funcionalidad del sistema y estudiar las señales no lineales Raman obtenidas se utilizarán muestras de solventes. El sistema aquí implementado es de gran utilidad como paso previo a la realización de imágenes espectrales Raman por primera vez en CICESE.

Palabras clave: Espectroscopía Raman, Esparcimiento Raman anti-Stokes coherente, óptica no lineal, chirp lineal, enfoque espectral, pulsos de femto-segundos, vibraciones moleculares.

Abstract of the thesis presented by **Giovanni Guzmán Santiago** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Optics with orientation in Optoelectronics:

Coherent Raman Spectroscopy using femto-seconds pulses and linear chirp

Abstract approved by

Dr. Israel Rocha Mendoza
Thesis Director

Biophotonics is a relatively new area of research that in just two decades has made great technological progress with the introduction of new imaging techniques with potential application in microbiology and biomedicine. Particularly for the study and manipulation of microscopic systems such as macromolecules, cells and biological tissue. This technological progress includes the innovation or improvement of existing techniques such as Raman spectroscopy, which is a very consolidated and useful tool for research in gas chemistry and solid state, for example, this for its ability to extract molecular spectral information from non-destructive and non-invasive manner. Transferring these Raman effect characteristics to an *in vivo* biological system has been subject of research for at least the past two decades. Unlike confocal microscopy, the Raman effect can be used to investigate molecular conformation without the use of fluorescent markers. However, the Raman effect physics occurs spontaneously, which makes it very inefficient, requiring long integration times in order to acquire the spectral information in a single point, or a very intense excitation above the damage threshold of any biological system. This makes it impossible to take quick pictures in any living biological specimen. In order to improve the efficiency of the Raman process, the use of non-linear optics in which ultrashort pulses are used to induce coherent (non-spontaneous) non-linear Raman effects. Non-linear Raman processes such as Stimulated Raman Scattering (SRS) and Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS) have been implemented with great success for rapid Raman imaging. This thesis describes an experimental work that aims to construct an optical system to perform Raman vibrational spectroscopy based on non-linear optical processes SRS and CARS, using a source of ultra-short femto-second laser pulses and linear *chirp*. To demonstrate the functionality of the system and to study the obtained non-linear Raman signals, solvent samples are used. The implemented system here is very useful as a preliminary step to the realization of Raman spectral images for the first time in CICESE.

Keywords: Raman Spectroscopy, Coherent Raman Scattering, Coherent anti-Stokes Raman Scattering, Linear chirp, spectral focus, spectral grid, methanol, DMSO, femto-seconds pulses, molecular vibrations.

Dedicatoria

Todo este esfuerzo necesario para llegar a superar esta etapa de la vida, no hubiese sido posible sin el apoyo incondicional de **mis padres, Sofía Santiago Hernández y Miguel Guzmán Colmenares**, quienes hicieron posible llegar a estas instancias gracias a sus recomendaciones, consejos y experiencia invaluable para seguir adelante en la vida. Los amo con todo mi corazón y estoy completamente agradecido de haber nacido, crecido y madurado bajo sus cuidados

Te dedico también con mucho cariño, María Hernández, mi abuelita; sé que desde el cielo nos observas

A la Biol. y M.C. Miriam Bautista por su inverosímil apoyo, comprensión, consejos y estar a mi lado en todo momento.

Agradecimientos

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)** por permitirme realizar mis estudios de maestría en el programa de Posgrado de Óptica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada durante mis estudios, mediante el programa de becas a través del número de becario 339290.

A mi director de tesis, **Dr. Israel Rocha Mendoza**, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y colaborar en este proyecto; por el tiempo, confianza, paciencia, dedicación, apoyo y conocimientos brindados.

A los miembros del comité de tesis, **Dra. Patricia Juárez Camacho, Dra. Karina Garay Palmett, Dr. Santiago Camacho López y Dr. Victor Coello Cárdenas**, por todo su apoyo, tiempo, sugerencias y valiosas contribuciones durante el trabajo de tesis.

Al encargado del laboratorio de óptica no lineal, el **Dr. Marcos Plata Sánchez**, por su completa disposición por instruirme en el uso de los equipos de trabajo de manera adecuada, así como a su apoyo en la realización de la etapa experimental de la presente tesis.

A la encargada del laboratorio de posgrado, **Dra. Marcia Padilla**, por iniciarme en el trabajo de laboratorio de óptica al inicio de la maestría.

Al coordinador del posgrado de óptica, el **Dr. Pedro Negrete Regagnon**, por todos sus consejos, recomendaciones y ayuda en momentos cruciales durante el transcurso del posgrado.

Al personal encargado del centro de cómputo de óptica, **Pedro Lereé e Isaac Reyes**, por su gran labor de administrar y apoyarnos en toda cuestión informática.

Al personal administrativo del departamento de óptica, **María del Carmen Ochoa y Marla Monjaraz**, por la ayuda con los numerosos trámites y difusión de información durante todos los cuatrimestres.

A la **M. A. Elizabeth Avilés Becerril** por su ayuda al solicitarle apoyo en la biblioteca de CICESE para la finalización de la presente tesis.

A todos mis compañeros de maestría y doctorado, especialmente a **Gabriela, Nayeli, Anna, Pamela, Cindy, Karen, Cecilia, Zúñiga, Ángel y Miguel** por haber compartido esta experiencia única, así como sus ánimos, consejos, tiempo, risas, reuniones y comprensión durante esta etapa académica.

A mi amigo **Vincent Montes** por su increíble amistad fuera de las aulas y laboratorios compartiendo aficiones y hobbies únicos.

A toda **mi familia** que me ha dado su apoyo incondicional y admiración por el camino que elegí seguir.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Del efecto Raman al efecto Raman coherente	2
1.2 Antecedentes de este trabajo	4
1.3 Justificación	5
1.4 Hipótesis.....	5
1.5 Objetivos	6
1.5.1. Objetivo general.....	6
1.5.2. Objetivos específicos.....	6
Capítulo 2 Fundamentos teóricos	7
2.1 Esparcimiento Raman Espontáneo	7
2.1.1 Descripción clásica del efecto Raman: Oscilador armónico.....	9
2.2 Mezcla de cuatro ondas en medios no lineales de tercer orden	11
2.2.1 Esparcimiento Raman Anti-Stokes Coherente (CARS)	13
2.2.2 Esparcimiento Raman Estimulado	17
2.2.3 Pérdidas y ganancias en el proceso del esparcimiento Raman estimulado (SR-L y SR-G)	19
2.3 Dispersión de velocidad de grupo de un material	21
2.4 Ensanchamiento de pulsos ultracortos.....	22
Capítulo 3 Materiales y métodos	29
3.1 Materiales	29
3.1.1 Vidrios dispersivos.....	29
3.1.2 Muestras	31

3.2. Equipo Principal.....	32
3.2.1 Oscilador Titanio:Zafiro	32
3.2.2 Espectrofotómetro	32
3.2.3 Platina de traslación micrométrica	33
3.2.4 Microscopio Raman (Olympus BX41 y láser Dimension-P2 Raman).....	33
3.3 Métodos de medición	33
3.3.1 Auto-correlación	33
3.4 Arreglo experimental.....	34
3.4.1. Obtención de hace de bombeo y Stokes.....	35
3.4.2. Ensanchamiento de pulsos: Configuración de Rejilla Temporal	36
3.4.3. Ensanchamiento de pulsos: Configuración para Enfoque Espectral.....	37
Capítulo 4 Resultados y discusiones	39
4.1 Espectros Raman de las muestras	39
4.2 Ensanchamiento de pulsos y espectros obtenidos	41
4.3 Extracción de señales Raman coherentes.....	45
4.4 Resultados con la configuración de rejilla temporal.....	48
4.5 Resultados con la configuración de enfoque espectral	54
Literatura citada	59

Lista de figuras

Figura		Página
1	(A) Imagen de células fibroblásticas a una banda Raman de 2845 cm^{-1} durante la infección con un megalovirus genéticamente modificado que muestra la proteína de fluorescencia verde. (B) es la proteína de fluorescencia. (C) imagen de campo brillante, (D) imágenes CARS y de 2-fotones sobrepuestas. Los tiempos de adquisición de (A) y (B) son de 40 $\mu\text{s}/\text{pixel}$. Las imágenes son el promedio de 4 escaneos, cada uno de 11 segundos. Tomada de (Iain Robinson, 2009).....	1
2		8
3		11
4		14
5		16
6	Principio de SRS, a) Diagrama de energía de SRS. Si la diferencia de frecuencias del Bombeo y Stokes es resonante con la vibración molecular, SRS ocurrirá y una molécula de la muestra se excita desde su estado base a uno vibracional. b) como resultado, un fotón del bombeo del campo de excitación es aniquilado (SRL, Pérdida de Raman Estimulado) y un fotón de Stokes es creado (SRG, Ganancia de Raman Estimulado) como requerimiento de la conservación de la energía. Tomada de (Christian W. Freudiger, 2011).....	18
7		19
8	Esquema de ensanchamiento temporal por vidrio de alta DVG. a), pulso ultra corto con su contenido de frecuencias modulado en un tiempo τ_0 . b), pulso ensanchado temporalmente con su frecuencia instantánea modulada en tiempo τ_L . Tomada de (Méndez Pfeiffer, 2014).....	22
9		25
10		25
11		29
12		30
13	Esquema del auto-correlador por absorción de dos fotones en un LED. Tomada de (García Arthur, 2003). 34	33

14		35
15		38
16		41
17		42
18		44
19	Obtención de espectros Raman coherente. a) Señal obtenida (curva verde) en dimetilsulfoxido (DMSO) y espectro inicial (curva negra) correspondiente a la suma de los espectros Stokes y bombeo. b) Espectro Raman coherente, se obtiene realizando la diferencia entre la señal obtenida y la suma de espectros mostrados en (a).	45
20		46
21		48
22		51
23	23. a) Espectros Raman coherente en diferentes muestras obtenidos con el arreglo de enfoque espectral. b) Espectros Raman espontáneo obtenidos con un equipo comercial.	53

Lista de tablas

Tabla		Página
1		12
2		30
3	Frecuencias vibratorias más significativas de las muestras utilizadas en el trabajo experimental.	39
4		48
5		50
6		52
7		54

Capítulo 1. Introducción

El estudio y comprensión de los mecanismos de función interna y propiedades moleculares de microorganismos vivos (células, bacterias, hongos, etc.), al igual que los mecanismos de enlace y organización de proteínas fibrosas que forman el tejido conectivo (colágeno, tubulina, elastina, etc.) han sido temas de gran interés durante años en la biología y medicina. En años recientes, las técnicas de microscopía y espectroscopía de alta resolución espacial y espectral, tales como la microscopía confocal y la espectroscopía Raman, han sido herramientas útiles para estos estudios. En particular, la microscopía confocal de barrido láser ha sido ampliamente utilizada por los investigadores en ciencias de la vida debido a su capacidad de adquirir de una forma rápida imágenes “tomográficas”. Esto, aunado con el uso de marcadores con proteínas fluorescentes ha potencializado su uso para estudiar, por ejemplo, la dinámica intracelular. (Tsien, 1998)

Recientemente, el interés en la espectroscopía vibracional ha resurgido en la comunidad biomédica y microbióloga por su capacidad de tomar imágenes de contraste químico libres de marcaje. Esto tiene ventaja sobre la microscopía confocal, ya que no se sabe si el uso de fluoróforos pueden o no modificar la funcionalidad celular, además de que los marcadores están sujetos a un efecto de “foto-blanqueo”. Los avances recientes en técnicas de imagen utilizando esparcimiento Raman Estimulado y anti-Stokes coherente han mostrado ser altamente sensibles, con órdenes de magnitud mucho mayores que la espectroscopía Raman convencional, siendo posibles velocidades de adquisición de video superiores, logrando por tanto la obtención de imágenes de procesos biológicos *in vivo*. (Christian W. Freudiger, 2011).

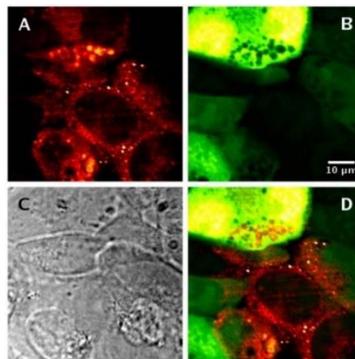


Figura 1. (A) Imagen de células fibroblásticas a una banda Raman de 2845 cm^{-1} durante la infección con un megalovirus genéticamente modificado que muestra la proteína de fluorescencia verde. (B) es la proteína de fluorescencia. (C) imagen de campo brillante, (D) imágenes CARS y de 2-fotones sobrepuestas. Los tiempos de adquisición de (A) y (B) son de 40 μs /pixel. Las imágenes son el promedio de 4 escaneos, cada uno de 11 segundos. Tomada de (Iain Robinson, 2009).

En este trabajo experimental, cuya implementación es la primera en el CICESE, y en México, las técnicas de micro-espectroscopía no lineal de esparcimiento Raman. Para esto se realizó un arreglo experimental para observar y estudiar los procesos de esparcimiento Raman estimulado (conocido como SRS, por sus siglas en inglés) y de esparcimiento Anti-Stokes Raman coherente (conocido como CARS, por sus siglas en inglés). Para lograr esto se buscó reproducir trabajos previos realizados en la Universidad de Cardiff, en Gales Reino Unido, (Rocha-Mendoza, Langbein, & Borri, 2008; Rocha-Mendoza, Langbein, & Borri, 2009) donde se utilizaron fuentes de pulsos láser en el régimen de femtosegundos y la técnica de ensanchamiento temporal lineal conocida como “chirp lineal” para obtener la resolución espectral necesaria para resolver la bandas Raman, cuyo tiempo de coherencia es típicamente de 1-2 picosegundos. La finalidad de este trabajo es obtener un arreglo experimental preliminar para desarrollar microscopía y, específicamente, estudiar los diferentes procesos Raman coherentes.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Del efecto Raman al efecto Raman coherente

En 1928, Raman observó que cuando luz monocromática con frecuencia ω_b incidía sobre un medio con moléculas (gases o líquidos y ausentes de polvo), la luz esparcida contenía un arreglo de diferentes colores (Raman, 1928). La componente más fuerte tenía la misma frecuencia que la luz incidente, ω_b , pero también otras contribuciones más débiles a diferentes frecuencias eran observadas. Tales frecuencias tenían un corrimiento de igual a $\omega_b \pm \omega_R$. Donde la primera contribución correspondía a la componente Rayleigh, mientras que las contribuciones desplazadas se conocen, ahora, como componentes de esparcimiento Raman. Las frecuencias desplazadas hacia el rojo se conocen como las componentes Stokes y mientras que las frecuencias corridas hacia el azul, se conocen como componentes anti-Stokes. Rápidamente, Raman se dio cuenta que las frecuencias ω_R correspondían a frecuencias características de movimientos moleculares y el espectro obtenido podía ser usado para identificar y caracterizar moléculas.

Tales movimientos moleculares correspondían a vibraciones de enlaces químicos individuales o de grupos de enlaces químicos colindantes. Debido a esto, el esparcimiento Raman se ha convertido en una técnica ampliamente aplicada al análisis molecular. Además, cuando es aplicada a microscopía, dicha

técnica permite la visualización de muestras sin marcaje (sin teñir) con contraste vibracional a una alta resolución espacial (Otto, 1997).

La desventaja principal de la técnica Raman es la debilidad intrínseca de ser un proceso espontáneo. Sólo una parte en 10^6 (órdenes de magnitud) de la radiación incidente se esparcirán en la frecuencia de Stokes al propagarse a través de 1cm de un medio activo Raman. Esta debilidad complica muchas aplicaciones incluyendo la imagen vibracional de muestras biológicas. Es entonces que los métodos de espectroscopía Raman estimulada coherentemente son de gran interés. La espectroscopía Raman coherente está basada en procesos ópticos no lineales. Los más comunes para microscopía son los procesos de esparcimiento Raman anti-Stokes Coherente (CARS, por sus siglas en inglés) y la espectroscopía Raman estimulada (SRS, por sus siglas en inglés) (Masters & T. C. So, 2008).

Para 1965, casi cuarenta años después del descubrimiento del efecto Raman, Maker y Terhune demostraron la posibilidad de obtener señales Raman más intensas al utilizar dos haces de luz coherente con frecuencias, ω_1 y ω_2 , respectivamente, se utilizaban para excitar un modo vibracional Raman (Maker, 1965). Esto era posible a través de la frecuencia de batido (la diferencia de frecuencia $\omega_R = \omega_1 - \omega_2$) de las ondas involucradas. Esta técnica no lineal, la cual fue más tarde denominada como espectroscopía de esparcimiento Raman anti-Stokes coherente (CARS), generó señales de hasta 10^5 órdenes de magnitud más fuertes que la espectroscopía Raman anti-Stokes espontánea (Begley, 1974). Debido a la gran utilidad, ya reconocida para ese entonces, de la espectroscopía Raman no es de sorprenderse que la técnica CARS vislumbraba muchas aplicaciones en física y química. Para la década de los noventa, con la aparición de fuentes de pulsos ultracortos, la técnica CARS incursionó con mucho éxito para realizar microscopía con contraste químico en células y tejidos. (Ji-Xin Cheng, 2002) (Zumbusch, 1999) para así agregar a la biología celular en la lista de aplicaciones para las técnicas basadas en Raman.

Casi por la misma época en que apareció CARS, el esparcimiento Raman estimulado (SRS) fue descubierto en los años 60's por Woodbury y Ng (Woodbury, 1962) esto mientras investigaban el proceso *Q-switching* en un láser de rubí con una celda Kerr que contenía nitrobenzono. Descubrieron que había una componente de la salida del láser a 1345 cm^{-1} desplazada por debajo de la frecuencia del láser. Análisis posteriores indicaron que dicho desplazamiento de frecuencia correspondía a la frecuencia vibracional del modo Raman más intenso de la molécula de nitrobenzono (Boyd, 2008). El esparcimiento Raman puede verse como un proceso de dos fotones en donde uno es absorbido y el otro es emitido cuando las moléculas se someten a la transición desde el estado inicial al final. Los términos "Stokes" y "anti-Stokes" se refieren a un corrimiento hacia frecuencias más bajas o altas del fotón esparcido,

respectivamente, con respecto a la frecuencia de los fotones de la luz incidente. Las componentes “Stokes” tienen órdenes de magnitud mayores comparados con los “anti-Stokes”.

Para el caso de microscopía SRS, ésta surgió como una alternativa a la microscopía CARS, ya que SRS elimina los problemas de señal de fondo (*background*) inherentes en CARS debido a una contribución no-resonante. Esto da como resultado un espectro Raman con contribución resonante y no resonante, tipo dispersivo. En contraste, en SRS la polarización no-lineal SRS de tercer orden es directamente heterodina (generación de nuevas frecuencias mediante la mezcla de dos o más señales en un material con propiedades no lineales) y amplificada por el haz de entrada con la misma fase y, por consiguiente, resulta en una nula contribución no-resonante. Consecuentemente, la forma espectral de SRS es idéntica a la de Raman espontáneo permitiendo una comparación directa en los espectros. Además, la señal SRS tiene una dependencia lineal a la concentración química, permitiendo un análisis cuantitativo (Masters & T. C. So, 2008).

La diferencia en las técnicas SRS y CARS estriba en el método de detección. Mientras que SRS es una configuración heterodina, esto es, la señal se genera y detecta sobre una de las frecuencias de excitación, la señal CARS es una configuración homodina, en el que la señal se detecta a una frecuencia diferente a las frecuencias de excitación. Esto conlleva a ciertas ventajas y desventajas de SRS y CARS, las cuales no serán discutidas en esta tesis, puesto que por lo pronto la principal meta es observar las señales.

1.2 Antecedentes de este trabajo

Previo a este trabajo de tesis, en CICESE se llevó a cabo una investigación para implementar y caracterizar la técnica de enfoque espectral utilizando el proceso de generación de suma de frecuencias ópticas. Dicha técnica de enfoque espectral es el paso intermedio requerido para desarrollar las técnicas de micro-espectroscopía óptica no lineal de esparsamiento Raman estimulado. (Méndez Pfeiffer, 2014)

El presente trabajo es inspirado por trabajos previos realizados en la Universidad de Cardiff, en Gales, Reino Unido, donde se demostró experimentalmente la posibilidad de realizar micro-espectroscopía CARS con alta resolución espectral, utilizando pulsos láser de femtosegundos como fuentes de excitación y chirp lineal, utilizando bloques de vidrios con alta dispersión de velocidad de

grupo, para obtener pulsos en picosegundos (I. Rocha-Mendoza, 2008) y (Wolfgang Langbein, 2009). Este trabajo busca pues reproducir estos resultados en CICESE con fines de realizar en un futuro cercano microscopía no lineal Raman.

1.3 Justificación

La biofotónica es un área de investigación relativamente nueva que ha tenido un gran progreso en tan solo dos décadas con la introducción de nuevas técnicas de microscopía no invasivas y no destructivas con potencial aplicación en microbiología y biomedicina, para estudiar dinámicas intracelulares y cambios morfológicos estructurales en las células y el tejido biológico, respectivamente (Prasad, 2003). Dado que en CICESE se cuenta con un departamento de microbiología experimental y una unidad biomédica, la incursión en esta rama mediante la implementación de técnicas avanzadas de microscopía justifica el presente trabajo. Con la implementación de técnicas de espectroscopía Raman coherente se busca ofrecer a estos departamentos una herramienta que pudiera ser útil para complementar sus respectivas investigaciones.

1.4 Hipótesis

Mediante el ensanchamiento temporal de pulsos ultracortos en el régimen de femtosegundos al régimen de picosegundos, utilizando vidrios de alta dispersión de velocidad de grupo, se podrán inducir y estudiar diferentes procesos ópticos no lineales Raman que serán útiles para implementar micro-espectroscopía Raman.

1.5 Objetivos

1.5.1. Objetivo general

- Implementar la técnica de espectroscopía Raman coherente con *chirp* lineal inducido.

1.5.2. Objetivos específicos

- Obtener espectros Raman coherentes en soluciones de solventes con espectros Raman espontáneo conocidos.
- Desarrollar un protocolo experimental para observar las señales de Raman coherente.
- Observar señales de esparcimiento Raman estimulado (SRS) y de esparcimiento Anti-Stokes Raman Coherente (CARS)

Capítulo 2. Fundamentos Teóricos

En este capítulo se describen en forma breve los conceptos básicos que dan fundamento teórico de esta tesis. Se inicia describiendo el *proceso de esparcimiento Raman espontáneo* haciendo derivación clásica de este efecto, después se continúa con una descripción general de los procesos ópticos resultantes de la *mezcla de cuatro ondas* en un medio óptico no lineal de tercer orden, tales como el *proceso de esparcimiento Raman anti-Stokes coherente (CARS)* y un proceso de *esparcimiento Raman estimulado (SRS)*. Se describe también el efecto simultáneo de la pérdida y ganancia Raman estimulada (SRL y SRG, respectivamente) que sufren los haces interactuantes, cuando su frecuencia de batido cae en resonancia con alguna de las frecuencias de vibración de las moléculas inmersas en el medio no lineal. Finalmente, se describe el ensanchamiento temporal de los pulsos utilizando vidrios de alta dispersión de velocidad de grupo (DVG), con la cual es posible implementar técnicas de *enfoque espectral y rendija temporal* para la obtención de espectros Raman con alta resolución espectral y espectros Raman multiplexados, respectivamente. Siendo esta última la técnica utilizada para la obtención de los resultados mostrados en esta tesis.

2.1 Esparcimiento Raman Espontáneo

El efecto Raman se entiende como una modulación de un campo electromagnético inducido por un campo externo que incide en la nube electrónica de las moléculas que conforman un material haciéndolas oscilar, el campo resultante exhibe componentes de frecuencias diferentes a la frecuencia del campo incidente, ω_p , llamadas Stokes y anti-Stokes, denotadas por ω_S y ω_{AS} , respectivamente. Este desplazamiento en frecuencia se debe a que la energía del campo incidente es esparcida al interactuar con los modos de energía de vibración molecular, ω_V . La frecuencia incidente puede estar en el rango del visible o en el infrarrojo cercano del espectro electromagnético ($1.5 - 3.7 \times 10^3$ THz, o 500 - 1250 nm), mientras que las frecuencias de vibración molecular están en el rango infrarrojo medio a lejano (75 - 470 THz, o 4 - 25 μm).

La Figura 2 esquematiza el proceso Raman el cual es espontáneo puesto que las condiciones del medio cambian gradualmente permitiendo al sistema adaptar su configuración de forma adiabática. Nótese que la frecuencia de la luz fuente excede por mucho las frecuencias de las vibraciones moleculares, $\omega_V \ll \omega_p$, por lo que las moléculas no son capaces de responder instantáneamente al

campo electromagnético. No obstante, los electrones sí siguen el campo de oscilación incidente de forma adiabática (Barry R. Masters, Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy, 2008) Visto desde el punto de vista cuántico, la densidad de probabilidad de estados vibracionales es modificada durante el proceso.

La frecuencia de los campos Raman en función de las frecuencias incidentes y de oscilación queda de la forma

$$\omega_{S, AS} = \omega_P \mp \omega_R \quad (1)$$

donde la diferencia y suma de frecuencias corresponden a las frecuencias, ω_S y ω_{AS} , respectivamente. Nótese que en el primer caso la molécula absorbe energía y en el segundo la molécula pierde energía puesto que se encuentra en un estado vibracional excitado.

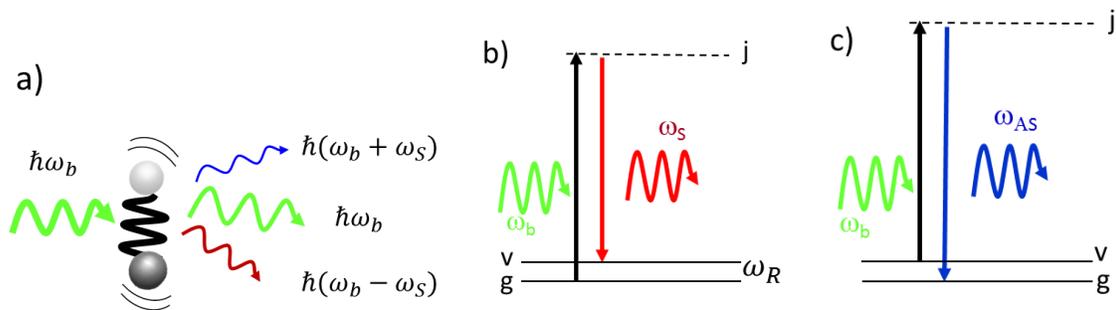


Figura 2. Esquema del esparcimiento Raman espontáneo, en donde (A) la luz incidente es esparcida en componentes Rayleigh (ω_b), Stokes ($\omega_S = \omega_b - \omega_R$) y componentes anti-Stokes ($\omega_{AS} = \omega_b + \omega_R$). (B) Diagrama de energía del esparcimiento Raman Stokes y (C) Esparcimiento Raman anti-Stokes Coherente (CARS). El nivel de estado base está etiquetado como “g”, el nivel vibracional como “v”, y el nivel intermedio como “j”. Lejos de la resonancia electrónica, los estados intermedios “j” tienen tiempos indefinidamente cortos de vida y estos deben ser considerados como estados virtuales. Las flechas rectas corresponden a luz aplicada y las flechas ondulantes indican radiación emitida. Tomada de (Barry R. Masters, Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy, 2008).

2.1.1 Descripción clásica del efecto Raman: Oscilador armónico

El fenómeno de esparcimiento Raman puede interpretarse como una variación espacial de las moléculas bajo influencia de la luz incidente. El campo electromagnético induce un momento dipolar, que a su vez radia a su frecuencia de oscilación. Con el campo aplicado de frecuencia ω_b expresado como $E(T) = E(r)e^{-i\omega_b t}$, el momento del dipolo inducido es (Barry R. Masters, Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy, 2008):

$$\mu(t) = \alpha(t)E(t) \quad (2)$$

Donde $\alpha(t)$ es la polarizabilidad del material. La respuesta Raman sigue de la presencia de los modos moleculares que afectan la polarizabilidad de la nube electrónica. Para incorporar este efecto, la polarizabilidad puede ser expresada como una función de la coordenada espacial, Q , y expandida al primer orden en una serie de Taylor (Placzek, 1934)

$$\alpha(t) = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial Q} Q(t) \quad (3)$$

Si se asume una simple oscilación armónica $Q(t) = 2Q_0 \cos(\omega_V t)$ para el modo, el momento dipolar eléctrico se expresa como

$$\mu(t) = \alpha_0 E(r) e^{-i\omega_b t} + \frac{\partial \alpha}{\partial Q} E(r) Q_0 \{ e^{-i(\omega_b - \omega_V)t} + e^{-i(\omega_b + \omega_V)t} \} \quad (4)$$

Donde el primer término a la derecha corresponde al esparcimiento Rayleigh de la frecuencia incidente, ω_b . El segundo término describe el esparcimiento Raman de frecuencias Stokes, $\omega_S = \omega_b - \omega_V$, mientras que el tercer término describe el esparcimiento Raman de frecuencias anti-Stokes, $\omega_{AS} = \omega_b + \omega_V$. Nótese en los procesos Raman dependen de que $\frac{\partial\alpha}{\partial Q} \neq 0$; es decir, del cambio de la polarizabilidad a lo largo de Q . Por lo tanto, el esparcimiento Raman ocurre sólo en moléculas para las cuales el campo aplicado trae consigo un cambio en la polarizabilidad a través del modo molecular. La condición del cambio de polarizabilidad forma las bases de las reglas de selección para la espectroscopía Raman, las cuales dependen de la simetría del modo de la molécula, reglas que no se discutirán en esta tesis.

La **magnitud** de la señal Raman es proporcional al diferencial de esparcimiento de la sección transversal, definido como el cuadrado de la intensidad esparcida dentro del ángulo sólido $\partial\Omega$, dividido por la intensidad incidente:

$$\sigma_{dif} \propto \left| \frac{\partial\alpha}{\partial\Omega} \right|^2 \quad (5)$$

Por tanto, la intensidad total de la luz Raman esparcida se encuentra entonces integrada en términos del ángulo sólido y sumando las contribuciones de esparcimiento de todas las N -moléculas incoherentemente se tiene que

$$I_{tot} = NI \int \sigma_{dif} d\Omega \quad (6)$$

donde se observa que la señal Raman espontánea es linealmente proporcional tanto a la intensidad de la luz incidente, I , y como al número de moléculas **esparcidoras**. Este modelo clásico provee una conexión empírica entre la sección transversal del esparcimiento Raman y las intensidades observadas de las

bandas Raman, pero es incapaz de predecir **fuerzas** de transición Raman (Barry R. Masters, Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy, 2008).

2.2 Mezcla de cuatro ondas en medios no lineales de tercer orden

El término “mezclada de cuatro ondas” (MCO) se reserva usualmente para la interacción de cuatro campos espacial o espectralmente distintos. MCO puede ser usado para ver tanto resonancias de un fotón como de dos fotones en un material midiendo las mejoras resonantes cuando una o más de estas frecuencias se sintoniza. Sintonizando las frecuencias a múltiples resonancias en el material, **secciones cruzadas** de estados excitados, tiempos de vida, anchos de línea pueden ser medidos. Otra ventaja de MCO es que las secciones transversales Raman pueden ser directamente comparadas sintonizando las dos diferencias de frecuencias a las dos transiciones Raman que interesen ($\omega_1 - \omega_2$ y $\omega_3 - \omega_2$). El MCO también tiene la ventaja de eliminar señales de fondo no resonantes presentes en otros métodos. La principal desventaja del MCO son las complicaciones que hay por traslapar 3 haces coherentes simultáneamente mientras se mantiene la condición de *phase matching* (Thiel, 2008).

La Figura 3 esquematiza los procesos Raman que ocurren en una mezcla de cuatro ondas (MCO); en ella se presentan los 3 procesos observados en éste trabajo de tesis, los cuales son SRG, SRL y CARS. Dichos procesos se obtienen como señales captadas por un espectrofotómetro (espectros). En resumen, los haces fundamentales de bombeo y Stokes incidirán sobre la muestra de interés enfocadas gracias al arreglo de lentes del objetivo de microscopio lo que ocasionará una interacción no lineal en las moléculas de la muestra. La señal colectada se analizará bajo los criterios de la Tabla 1.

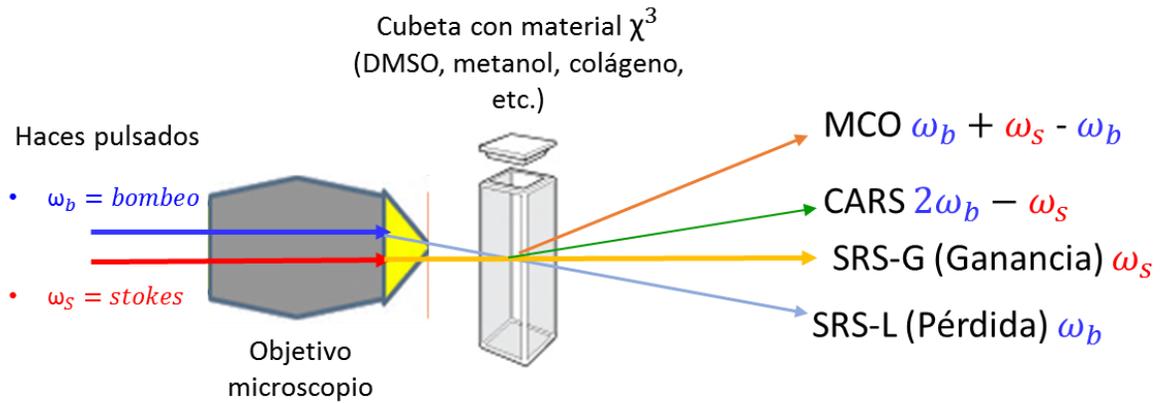


Figura 3. Diagrama de los procesos Raman coherentes y la relativa orientación de salida de las señales detectada en distintos métodos de espectroscopía Raman ($\omega_b > \omega_s$ y $\omega_b - \omega_s$ esta cerca de la resonancia Raman). Tomada de (Thiel, 2008).

La Tabla 1 resume los efectos mostrados en la Figura 3 en la cual se indica la interacción no lineal, la variable experimental, la variable medida y la información obtenida. Por ejemplo, para el proceso de ganancia Raman (SRG) la interacción no lineal ocurre en la variable de ω_s (la de Stokes), en la cual observaremos un espectro de ganancia en dicha frecuencia y, por ende, veremos información relevante en niveles Raman del espectro. El mismo criterio se aplica para el proceso SRL (pérdida Raman) salvo que se detectan señales de pérdidas (destrucción de fotones en diversas frecuencias del espectro) en la variable ω_b (del bombeo). El proceso CARS es una señal que se puede detectar después de la obtención y análisis de los espectros Raman de ganancia y pérdida. Como se observa, CARS es un proceso que conlleva una interacción estimulada en el que su principal ventaja es proporcionar más información de la muestra analizada, en comparación con SRG y SRL.

Tabla 1. Aplicaciones en espectroscopía de mezclado de cuatro ondas (Thiel, 2008).

Interacción no lineal	Variable	Variable medida	Información obtenida
MCO $\omega_4 = \omega_b + \omega_s - \omega_b$	$\omega_b - \omega_b$ $\omega_s - \omega_b$	Intensidad en ω_4	Niveles Raman, Susceptibilidades, tiempos de vida.
SRG $\omega_s = \omega_b + \omega_s - \omega_b$	ω_b	Ganancia en ω_s	Niveles Raman
SRL $\omega_s = \omega_b + \omega_s - \omega_b$	ω_s	Pérdidas en ω_b	Niveles Raman
CARS $\omega_4 = 2\omega_b - \omega_s$	ω_b	Intensidad en ω_4	Niveles de energía Raman, susceptibilidades, tiempos de vida, etc.

2.2.1 Esparcimiento Raman Anti-Stokes Coherente (CARS)

El esparcimiento Raman anti-Stokes coherente (CARS) en un proceso de mezcla de cuatro ondas en la cual un haz de bombeo, ω_b , un haz Stokes, ω_s , y un haz de prueba, ω_{b2} , inducen una polarización $P^{(3)}$ en la muestra. Esta polarización inducida da lugar a una radiación anti-Stokes con una frecuencia (Michiel Muller, 2007), como se muestra en la Figura 4a:

$$\omega_{AS} = \omega_b + \omega_{b2} - \omega_s \quad (7)$$

Comúnmente, se realizan experimentos de manera que las frecuencias de bombeo y prueba sean degeneradas (energías iguales) obtenidas del mismo láser, de tal manera que

$$\omega_{AS} = 2\omega_b - \omega_s \quad (8)$$

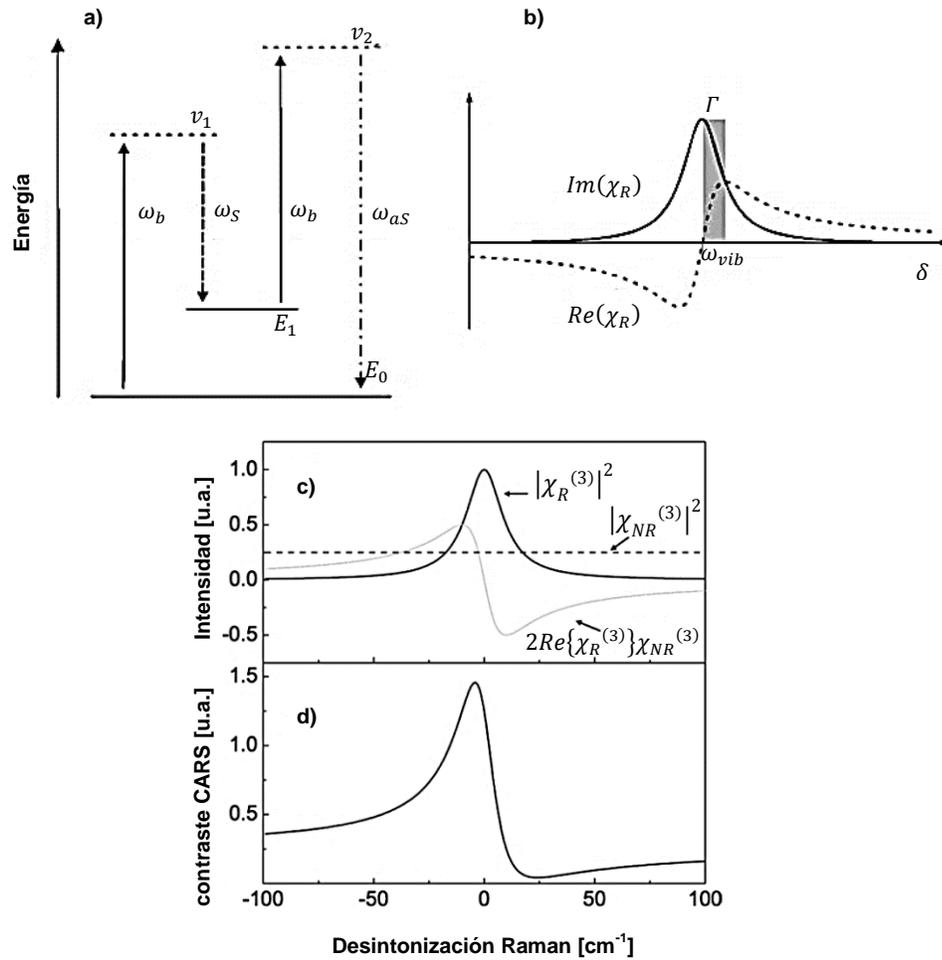


Figura 4. a) Esquema de niveles CARS. b) Contribuciones real ($Re\{\chi_R^{(3)}\}$) e imaginaria ($Im\{\chi_R^{(3)}\}$) de la banda Raman con el ancho de línea de Γ . Contribuciones del espectro CARS en c) La variación espectral de la parte real e imaginaria de la componente resonante, modelada con una línea Lorentziana simple con $\Gamma_v = 10\text{cm}^{-1}$, y la componente no resonante y d) Señal CARS total encontrada al sumar todas las contribuciones dadas en (c). a) y b) extraídas de (Michiel Muller, 2007). c) y d) de (Barry R. Masters, Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy, 2008).

La intensidad de la señal CARS es proporcional al módulo cuadrado de la polarización inducida

$$I_{CARS} \propto |P^{(3)}|^2 \quad (9)$$

Donde la magnitud de $P^{(3)}$ es determinada por la fuerza del campo E de los campos de excitación y la susceptibilidad óptica no lineal del material $\chi^{(3)}$, la cual está compuesta por una componente resonante, $\chi_R^{(3)}$ y otra no resonante, $\chi_{NR}^{(3)}$ respectivamente. Entonces

$$P^{(3)} = (\chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)})E_p E_p E_s^* \quad (10)$$

En ausencia de resonancias electrónicas implícitas en la componente no resonante, tanto CARS como Raman espontáneo proveen, en principio, la misma información. El esparcimiento Raman espontáneo está, de hecho, muy relacionado con la parte imaginaria de la susceptibilidad no lineal, $Im\{\chi_R^{(3)}\}$. Sin embargo, la forma espectral CARS difiere de la forma espectral del Raman espontáneo debido a la interferencia entre las contribuciones real e imaginaria de la susceptibilidad no lineal. Esto se puede entender de la expresión compleja para la parte resonante de la susceptibilidad no lineal de tercer orden la cual está dada por

$$\chi_R^{(3)} = \sum_j \frac{R_j}{\Omega_j - (\omega_b - \omega_s) - i\Gamma_j} = Re\{\chi_R^{(3)}\} + Im\{\chi_R^{(3)}\} \quad (11)$$

La cual es una sumatoria compleja sobre todas las resonancias vibracionales- j involucradas, con eigen-frecuencias Ω_j , fuerzas osciladoras R_j , y anchos de línea Γ_j . Si uno separa la parte real y la parte imaginaria de esta expresión se dará cuenta que la parte real tiene una forma lineal dispersiva, mientras que la parte imaginaria, la cual refleja las líneas de Raman espontáneo, tiene una forma Lorentziana (como se muestra en la Figura 4b).

Entonces, la forma del espectro CARS es el resultado de la suma coherente de ambas componentes resonantes y no resonantes (Figura 4c)

$$I_{CARS} \propto |\chi_R^{(3)} + \chi_{NR}^{(3)}|^2 = |\chi_R^{(3)}|^2 + 2\chi_{NR}^{(3)} \text{Re}\{\chi_R^{(3)}\} + |\chi_{NR}^{(3)}|^2 \quad (12)$$

De aquí que los espectros CARS típicamente muestran una forma lineal dispersiva. Esto se puede ver en la Figura 4d, comparada al espectro Raman espontáneo, las resonancias vibracionales CARS exhiben corrimientos de frecuencias en el pico de amplitud relativo (Michiel Muller, 2007).

Para microscopia CARS la contribución no resonante puede, a veces, ser problemático, ya que para resonancias vibracionales débiles, el *background* puede alcanzarlo o, bien, dominarlo. En muestras biológicas, como por ejemplo células, las concentraciones moleculares en sus estructuras internas es usualmente baja para inducir CARS, mientras que el fondo no resonante de la acuosidad circundante está generalmente en todas partes. Por lo tanto, suprimir la contribución no resonante es esencial en ciertas aplicaciones. Pero, por otro lado, cuando las concentraciones moleculares son tales que ofrecen una señal CARS resonante eficiente, como por ejemplo lípidos o estructuras vesiculares, la señal no resonante resulta un buen medio de contraste para distinguir el fondo acuoso de una célula (Barry R. Masters, Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy, 2008).

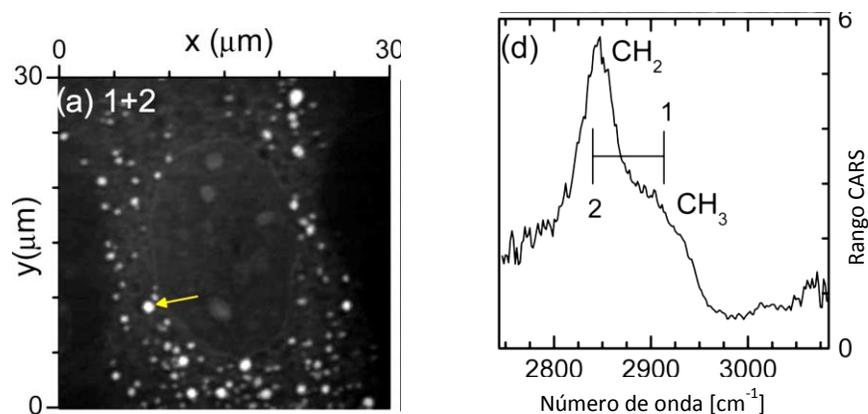


Figura 5. a) Célula HeLa mostrando señal resonante en los lípidos (vibraciones CH₂) y proteínas del núcleo (vibraciones CH₃), mientras que la señal no resonante hace visible la periferia de la célula. B) Espectro CARS en célula HeLa mostrando la contribución resonante y no-resonante. Tomada de (Rocha-Mendoza, Langbein, & Borri, 2009).

2.2.2 Esparcimiento Raman Estimulado

En años recientes, la microscopía de esparcimiento Raman estimulado (SRS) ha emergido como una alternativa a la microscopía CARS ya que SRS elimina los problemas de fondo no-resonante porque la polarización no-lineal SRS de tercer orden es directamente heterodina y amplificada por el haz de entrada con la misma fase y, por consiguiente, resultando en una nula contribución no-resonante. Consecuentemente, la forma espectral de SRS es idéntica a la de Raman espontáneo permitiendo una comparación directa (Dan Fu, 2013).

Para obtener información de una banda Raman diferente, uno de los láseres tiene que ser sintonizado en una longitud de onda distinta, lo cual típicamente involucra un cambio en la longitud de la cavidad, un cambio en la temperatura del cristal o ambos casos (Dan Fu, 2013).

El caso más común de espectroscopía SRS usa pulsos de picosegundos sincronizados, donde la resolución espectroscópica es determinada por el ancho de banda de ambos haces de picosegundos. Si se usan pulsos limitados en transformada se obtienen señales con mayor intensidad, pero con resolución espectral reducida (Potma & Mukamel, 2012). Para resolver el problema de resolución espectral angosta y ancho de banda espectral grande, se ha desarrollado una técnica de excitación por pulsos con *chirp*, también conocida como “enfoco espectral” (Hellere T, 2004) (Dan Fu, 2013).

El fundamento teórico para SRS y CARS es muy similar. Cuando los dos pulsos de entrada son pulsos gaussianos en femtosegundos linealmente con “chirp” (por simplicidad, el mismo “chirp” y los parámetros de ancho de banda son asumidos para ambos pulsos), podemos expresar el campo eléctrico de entrada como (Dan Fu, 2013):

$$E = \frac{A_1 e^{i(k_1 z - \omega_1 t + \omega_1 t_0)}}{\sqrt{\tau} e^{-(t-t_0)^2/2\tau^2} e^{-ib(t-t_0)^2}} + \frac{A_2 e^{i(k_2 z - \omega_2 t)}}{\sqrt{\tau} e^{-t^2/2\tau^2} e^{-ibt^2}} + c. c. \quad (13)$$

Donde A , k , ω , τ , t_0 y b representan, respectivamente, la amplitud, el vector de onda, número de onda, duración del pulso, retraso entre pulsos, y el “chirp” de los pulsos en propagación. La eficiencia de excitación de ambos pulsos con “chirp” es equivalente a dos pulsos en picosegundos de banda angosta

limitada en transformada con las mismas duraciones de pulso. La relación entre el parámetro de “chirp”, b , la duración del pulso con “chirp”, $\Delta\tau$, y el ancho de banda del pulso con “chirp”, $\Delta\lambda$, es (Dan Fu, 2013):

$$b = \sqrt{\left(\frac{\pi c \Delta\lambda}{\lambda^2 \Delta\tau}\right)^2 - \frac{4(\ln 2)^2}{\Delta\tau^4}} \quad (14)$$

Más importante, el retraso entre el pulso de bombeo y Stokes afectan con un cambio en la frecuencia de oscilación Raman desde $\omega_b - \omega_s$ a $\omega_b - \omega_s - 2bt_0$.

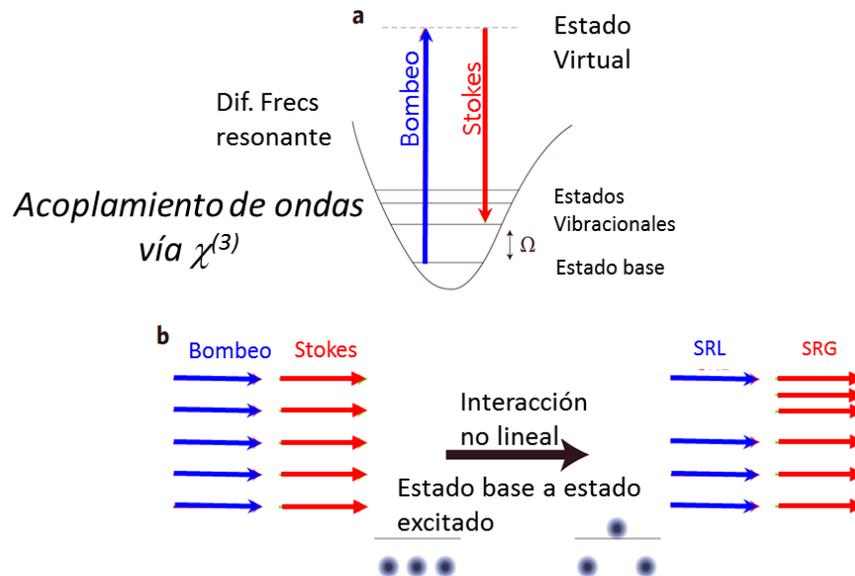


Figura 6. Principio de SRS, a) Diagrama de energía de SRS. Si la diferencia de frecuencias del Bombeo y Stokes es resonante con la vibración molecular, SRS ocurrirá y una molécula de la muestra se excita desde su estado base a uno vibracional. b) como resultado, un fotón del bombeo del campo de excitación es aniquilado (SRL, Pérdida de Raman Estimado) y un fotón de Stokes es creado (SRG, Ganancia de Raman Estimado) como requerimiento de la conservación de la energía. Tomada de (Christian W. Freudiger, 2011).

Hablando en general del esparcimiento Raman coherente (CRS), la muestra se excita coherentemente con dos láseres, uno a la frecuencia de bombeo y el otro a la frecuencia de Stokes. Cuando su diferencia de frecuencias empata una vibración molecular de la misma frecuencia que Ω ,

ocurren los efectos de CARS y SRS debido a la interacción no lineal de las moléculas con los pulsos del láser (ver Figura 2b,c y Figura 6a). En SRS, un fotón de bombeo es convertido a un fotón de Stokes cuando la molécula es excitada desde un estado vibracional base a un primer estado vibracional excitado, lo que resulta en una pérdida de intensidad ΔI_b del haz de bombeo, y una ganancia de intensidad ΔI_s del haz de Stokes (ver Figura 6b). A diferencia del CARS, el fenómeno SRS no sufre de señales no-resonantes de *background* y los espectros de SRS son idénticos a los vistos en el esparcimiento Raman espontáneo, permitiendo un mejor reconocimiento de señales basándose en literatura Raman (Christian W. Freudiger, 2011).

2.2.3 Pérdidas y ganancias en el proceso del esparcimiento Raman estimulado (SR-L y SR-G)

En la implementación original de Espectroscopía SRS, se usan haces láser de banda angosta (pulsos limitados en transformada) para excitar un solo modo vibracional Raman como se aprecia en la Figura 7a. Sin embargo, otros modos vibracionales de la misma muestra no fueron excitados. Entonces, esta aproximación no aprovecha las ventajas de la especificidad del esparcimiento Raman coherente y falla en detectar moléculas con bandas Raman traslapadas (Christian W. Freudiger, 2011).

En lugar de usar dos pulsos estrechos, se usa un pulso de bombeo con un ancho de banda amplio y un haz de Stokes con banda estrecha, de tal manera que un rango espectral amplio de frecuencias vibracionales pueda ser excitado simultáneamente, tal como se muestra en la Figura 7b (Christian W. Freudiger, 2011).

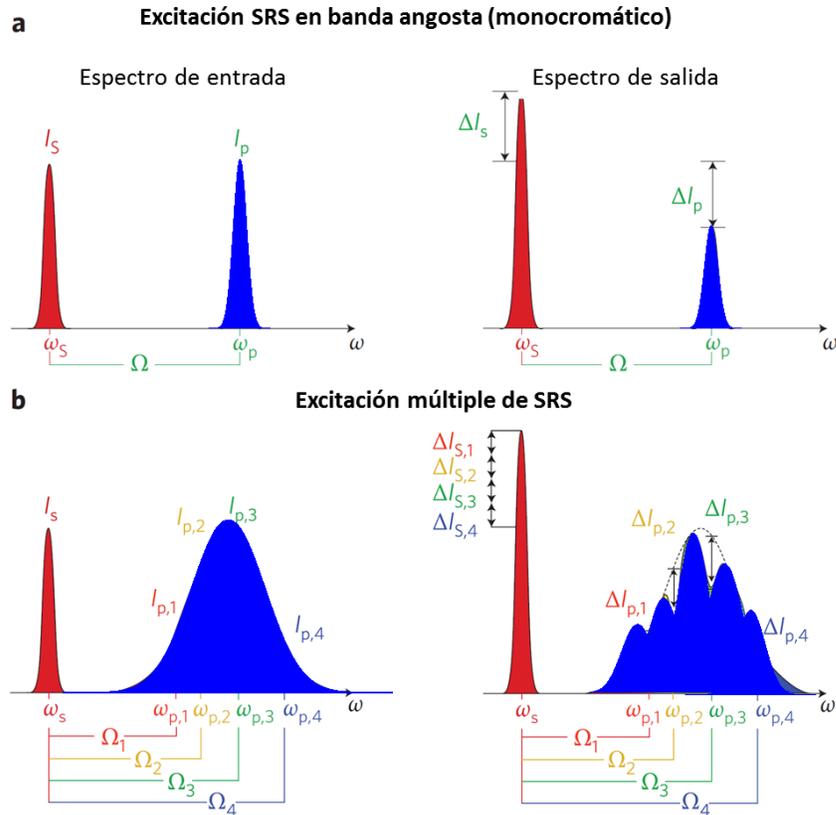


Figura 7. a) Excitación de banda angosta. Pulsos láser de banda estrecha a frecuencia de bombeo ω_p y Stokes ω_s excitan una simple vibración molecular Ω . La SRL o SRG resultante de la intensidad del bombeo o Stokes se mide. b) Excitación múltiple. El haz de bombeo es ensanchado para excitar simultáneamente múltiples vibraciones moleculares Ω_i de la muestra. Una componente espectral $I_{p,i}$ con frecuencia $\omega_{p,i}$ experimenta una pérdida de intensidad $\Delta I_{p,i}$ cuando su diferencia de frecuencias con el haz Stokes de banda estrecha $\Delta\omega_i = \omega_{p,i} - \omega_s$ empata a Ω_i . La ganancia de intensidad total del haz de Stokes $\Delta I_s = \sum_i \Delta I_{s,i}$ se origina de la SRS de todas las vibraciones moleculares de la muestra. La micro-espectroscopía se realiza por dispersar la señal de bombeo transmitido dentro de un detector de múltiples elementos y midiendo la $\Delta I_{p,i}$ individual. Tomada de (Christian W. Freudiger, 2011).

Para llevar a cabo la medición de las señales SRG y SRL, éstas son medidas en frecuencias similares a las del campo incidente (ω_b y ω_s). Aunque todas las señales de Esparcimiento Raman Coherente (CRS) derivan de la misma interacción Raman con la molécula, hay diferencias con respecto a la señal CARS que también se colecta, tales como la intensidad de la excitación y la concentración de las moléculas en la muestra (Alba Alfonso-García, 2014)

La señal SRL se detecta en la frecuencia óptica ω_b , la cual es una frecuencia igual a la del láser de bombeo (señal pulsada del Ti:Za). Debido a que CRS es coherente, hay una relación de fase entre esta radiación CRS y la señal de bombeo (incidente). En consecuencia, la señal SRL es detectada como la interferencia entre el haz de bombeo y la respuesta CRS (Alba Alfonso-García, 2014).

2.3 Dispersión de velocidad de grupo de un material

El fenómeno de dispersión óptica es la separación de las ondas de distinta frecuencia (o longitud de onda) que compone un haz de luz al atravesar un material. Tal separación se debe a que la velocidad de cada onda, o *velocidad de fase*, es diferente para cada frecuencia óptica. Todos los medios materiales son dispersivos, y la dispersión afecta a todas las ondas. Cuando la luz blanca (compuesta por todas las frecuencias del espectro visible) pasa a través de un bloque de vidrio, las diferentes longitudes de onda son refractadas (desviadas) si las superficies del bloque no son paralelas, como en un prisma, por ejemplo; donde la luz azul se desvía más que la luz roja. En contraste, cuando la luz blanca incide normal a la superficie de un bloque de vidrio (de caras paralelas), las longitudes de onda sólo se separan unas de otras por la diferente velocidad de fase en el medio, en donde viajan más rápido las longitudes de onda mayores (de menor frecuencia o energía); esto es, las ondas de color rojo viajan más rápido que las de color azul.

Matemáticamente, la velocidad de fase, la velocidad de grupo y la dispersión de velocidad de grupo se pueden deducir desarrollando en una serie de Taylor de la constante de propagación, $k(\omega)$, alrededor de la frecuencia central del paquete de ondas (pulsos ultracortos en nuestro caso) de la forma:

$$k(\omega) = k_0 + k' \times (\omega - \omega_0) + \frac{1}{2}k'' \times (\omega - \omega_0)^2 + \dots, \quad (15)$$

donde ω_0 es la frecuencia central dada en radianes por segundo y los términos k_0 , k' , k'' están dados por las expresiones:

$$k_0 \equiv k(\omega)|_{\omega=\omega_0} = \frac{\omega_0}{v_p(\omega_0)}, \quad (16)$$

$$k' \equiv \left. \frac{dk}{d\omega} \right|_{\omega=\omega_0} = \frac{1}{v_g(\omega_0)}, \quad (17)$$

$$k'' \equiv \left. \frac{d^2 k}{d\omega^2} \right|_{\omega=\omega_0} = \frac{d}{d\omega} \left(\frac{1}{v_g(\omega_0)} \right). \quad (18)$$

La expresión (16) relaciona la constante de propagación con la velocidad de fase $v_\phi(\omega)$ que corresponde a la velocidad con la que se mueven las oscilaciones de cada frecuencia ω dentro del pulso. La expresión (17) es el cambio de la constante de propagación con respecto a la frecuencia y es inversamente proporcional a la velocidad de grupo, $v_g(\omega)$ que, a diferencia de la velocidad de fase, define la velocidad a la que viaja la envolvente del pulso. Finalmente, la expresión (18), describe la dispersión de velocidad de grupo, la cual nos dice que la velocidad de grupo no es la misma para todas las frecuencias contenidas en el pulso, lo que causa que la forma su envolvente cambie cuando interactúa con materiales dispersivos.

2.4 Ensanchamiento de pulsos ultracortos

Un pulso ultracorto está compuesto por un paquete de ondas de diferente frecuencia, por lo que sufre dispersión. Nótese que un pulso viaja en su conjunto a una velocidad específica pero cada frecuencia óptica que contiene el pulso viaja a una velocidad diferente. Esto es el pulso en su conjunto se mueve una velocidad conocida como *la velocidad de grupo* mientras que cada onda tiene una velocidad de fase. El efecto de dispersión se puede acentuar cuando el medio material tiene una *dispersión de velocidad de grupo* grande; esto es, cuando el cambio la velocidad de grupo es función también de las frecuencias. Para los pulsos ultracortos este efecto puede ser nocivo puesto que la dispersión separa las componentes de su espectro y como consecuencia el pulso sufre un ensanchamiento temporal, tal y como se explicará más adelante, aunque para otros fines, como el que se persigue en este trabajo, este proceso de separación temporal en las frecuencias es de hecho benéfico siempre y cuando se tenga un buen control sobre él.

La Figura 8 esquematiza el ensanchamiento temporal de un pulso que se propaga una distancia, z , a través de un vidrio de alta DVG de longitud L , se puede apreciar que el pulso inicialmente corto de duración τ_0 se hace más ancho $\tau(z = L)$ y también cómo el contenido de frecuencias no cambia, simplemente se modula la frecuencia instantánea linealmente a lo largo del tiempo.

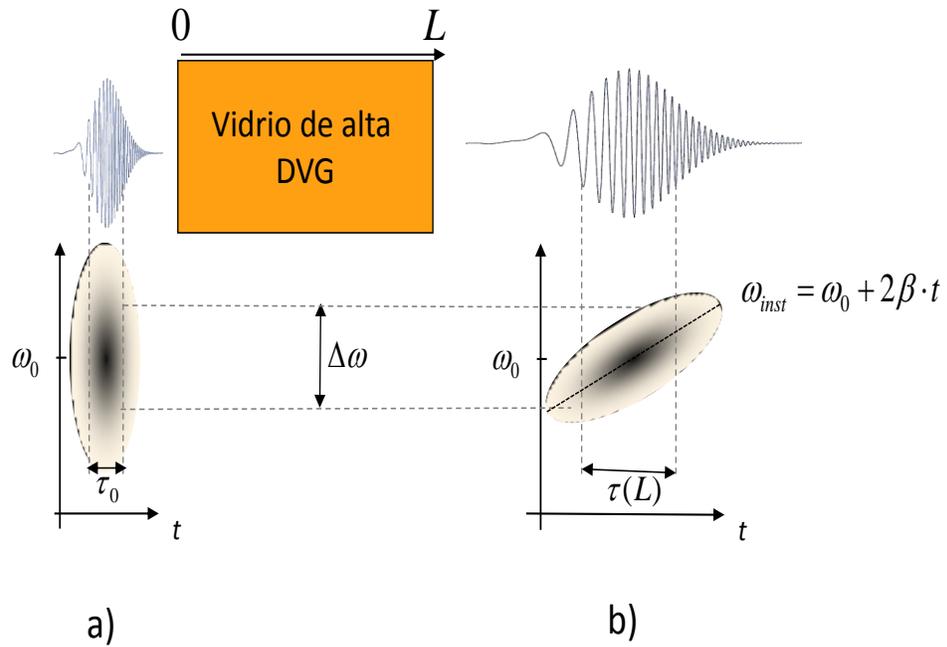


Figura 8. Esquema de ensanchamiento temporal por vidrio de alta DVG. a), pulso ultra corto con su contenido de frecuencias modulado en un tiempo τ_0 . b), pulso ensanchado temporalmente con su frecuencia instantánea modulada en tiempo τ_L . Tomada de (Méndez Pfeiffer, 2014).

El ancho del pulso puede calcularse con la *expresión del ensanchamiento temporal* dada por (I. Rocha-Mendoza, 2008) y (Méndez Pfeiffer, 2014):

$$\tau(z) = \tau_0 \sqrt{1 + \left(\frac{4 \ln 2 |k''| z}{\tau_0^2} \right)^2}, \quad (19)$$

igualmente, el parámetro β (o simplemente el parámetro del chirp), se puede calcular con la *expresión del parámetro chirp* dada por

$$\beta(z) = 8(\ln 2)^2 |k''| z \tau_0^{-2} \tau^{-2}. \quad (20)$$

Ambas ecuaciones (19 y 20) son función del ancho inicial del pulso τ , la distancia z y la dispersión de velocidad de grupo (DVG) del material k'' , dada en la ecuación (4), la cual se puede reescribir en términos de la longitud de onda, $\lambda = 2\pi n(\lambda)c/\omega$, para obtener

$$k'' = \frac{\lambda^3}{2\pi c^2} \frac{d^2 n}{d\lambda^2}, \quad (21)$$

donde c es la velocidad de la luz y n es el índice de refracción del material dependiente de la longitud de onda. La expresión (21) se puede estimar numéricamente conociendo el material y calculando el índice de refracción en función de las longitudes de onda con la expresión de Sellmeier,

$$n^2(\lambda) = 1 + \frac{B_1\lambda^2}{\lambda^2 - C_1} + \frac{B_2\lambda^2}{\lambda^2 - C_2} + \frac{B_3\lambda^2}{\lambda^2 - C_3}, \quad (22)$$

donde B_j , y C_j , con $j = 1, 2, 3$, son parámetros que dependen del material y se encuentran documentados.

Una vez calculada la dispersión de velocidad de grupo, es posible estimar el ensanchamiento temporal y, a su vez, estimar el parámetro chirp, para finalmente conocer la modulación temporal inducida mediante la ecuación de la frecuencia instantánea:

$$\omega_{inst} = \omega_0 + 2\beta t \quad (23)$$

2.4.1 Enfoque espectral y rendija temporal

Para explicar el enfoque espectral hará una analogía con el enfoque de una fuente de luz. La Figura 9a) (Méndez Pfeiffer, 2014) esquematiza cómo un haz de luz no enfocado, de diámetro mayor que el tamaño del objeto, no puede resolver los detalles finos del objeto, mientras que si se utiliza una lente (o un objetivo de microscopio) la luz se enfocará y se podrán resolver los detalles más pequeños del objeto. De manera similar puede pensarse que para obtener resolución espectral necesitamos también alguna técnica óptica que lo lleve a cabo. La Figura 9c) muestra un espectro Raman de alguna muestra de interés y **la envolvente gaussiana del campo eléctrico** resultante de la interacción de dos pulsos ultracortos sin chirp. Debido al gran contenido espectral viajando en fase de cada uno de los pulsos, su interacción hará oscilar diferentes frecuencias Raman del espectro al mismo tiempo y no habrá resolución espectral. Sin embargo, tal y como se argumentó arriba, si mediante alguna técnica óptica es posible hacer que la interacción de los pulsos “enfoque” el contenido de frecuencias de los pulsos para excitar una sola banda Raman, existirá resolución espectral, tal y como se esquematiza en la Figura 9b) y d). En este caso, el instrumento óptico para enfocar el espectro consiste en la técnica de enfoque espectral; la cual se logra mediante la igualación del chirp de ambos pulsos, tal y como se describe más adelante en la Figura 10.

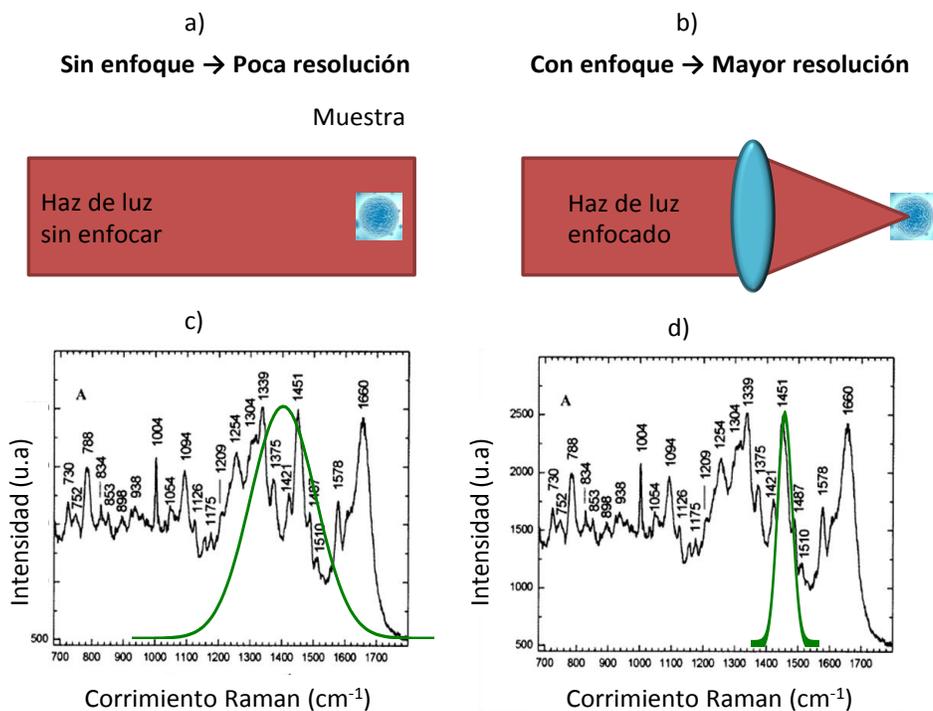


Figura 9. Al aplicar la técnica de enfoque espectral, se tiene mayor resolución espectral en las bandas Raman, así como en microscopía con un mayor enfoque, se tiene una mayor resolución espacial. Tomada de (Méndez Pfeiffer, 2014).

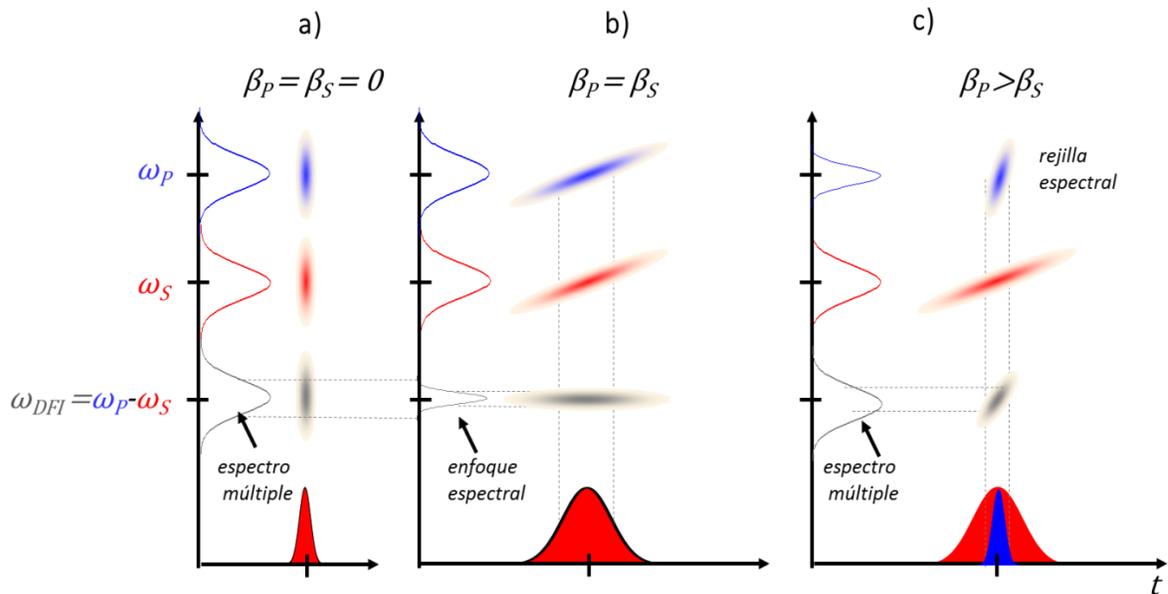


Figura 10. Interacción de pulsos de bombeo y Stokes sin *chirp* (a) resulta en un espectro múltiple, es decir, sin resolución espectral; cuando el ancho de los pulsos es igual (b) la DFI es constante y existe resolución espectral; y cuando la cantidad de chirp es mayor en el haz de bombeo el haz Stokes funciona como una rendija temporal dando como resultado un espectro múltiple.

La Figura 10 esquematiza tres casos particulares de la interacción de los pulsos de bombeo y Stokes, por medio de su frecuencia instantánea

$$\omega_{P,S} = \omega_{P0,S0} + 2\beta_{P,S}\tau_{P,S}, \quad (24)$$

donde τ y β , son el ancho temporal y el parámetro *chirp*, respectivamente, mientras que los subíndices, P, S, indican bombeo y Stokes. Nótese que se trata de una ecuación lineal y físicamente indica una distribución lineal del contenido espectral a lo largo del ancho temporal, donde $\omega_{P0,S0}$ son las frecuencias centrales de los pulsos y los parámetros del chirp es la pendiente de la ecuación.

En el primer caso, Figura 10a), los pulsos están limitados en transformada; esto es, los haces no presentan chirp, $\beta_s = \beta_p = 0$ y su ancho temporal es mínimo ya que el producto del ancho temporal con

el ancho espectral es el mínimo posible, según la relación $\tau \times \Delta\omega < 0.22/\pi$. En este caso la interacción resultante en la diferencia de frecuencia instantánea es

$$\sum_{i,j}^{MN} \Delta\omega_{i,j} = \sum_i^M (\omega_{Pi} - \sum_j^N \omega_{Sj}), \quad (25)$$

donde M y N son el total de frecuencias dentro del ancho de banda del pulso de bombeo y Stokes, respectivamente. El resultado de la diferencia de frecuencias interferencial resulta en excitación múltiple de modos vibracionales debido a la interacción cada una las i -ésimas frecuencias de bombeo con todas las j -ésimas frecuencias Stokes contenidos en los espectros, excitando un total de MN posibles oscilaciones, respectivamente.

En el segundo caso, Figura 10b), ambos pulsos presentan el mismo chirp, $\beta_S = \beta_P \neq 0$, teniendo el mismo ancho temporal, τ . Aquí la interacción resultante en la diferencia de frecuencia instantánea es constante de la forma

$$\Delta\omega = (\omega_{P0} - \omega_{S0}) + 2(\beta_P - \beta_S)\tau = (\omega_{P0} - \omega_{S0}). \quad (26)$$

Puesto que la DFI es constante igual a la diferencia de las frecuencias centrales se dice que existe enfoque espectral; ya que la DFI es la misma en todo el tiempo excitando una sola frecuencia.

El tercer caso, mostrado en la Figura 10c) es cuando el chirp de los pulsos es diferente tal que $\beta_P \gg \beta_S$. En este caso podemos considerar que el haz de bombeo sigue estando limitado en transformada ($\beta_P = 0$) por lo que $\tau_P \ll \tau_S$, quedando la diferencia de frecuencias instantánea de la forma

$$\sum_i^M \Delta\omega_i = \sum_i^M (\omega_{Pi} - (\omega_{S0} + 2\beta_S\tau_S)), \quad (27)$$

lo cual resulta también en excitación múltiple, pero en este caso todas las i -ésimas frecuencias del haz de bombeo interactúan con una pequeña fracción de las frecuencias Stokes. Puesto que $\tau_P \ll \tau_S$, las diferencias de frecuencias dependen de la sección de interacción τ_P en dentro del ancho temporal τ_S , actuando entonces el haz de bombeo como una *rendija temporal* de interacción.

Capítulo 3. Materiales y métodos

En éste capítulo se describen los materiales y métodos de la presente tesis. Se inicia describiendo las características de los materiales utilizados en los experimentos, tales como los bloques de vidrio dispersivo para generar el *chirp* y las muestras utilizadas para la obtención de los espectros Raman las cuales son dos soluciones solventes tales como dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol, así como poliestireno. Al final del capítulo se describen los arreglos experimentales empleados para obtener la señal Raman coherente (SRS y CARS).

3.1 Materiales

3.1.1 Vidrios dispersivos

La dispersión de velocidad de grupo en materiales transparentes se determina por el número de Abbe (Optics.inc, 2014)

$$V = \frac{n_D - 1}{n_F - n_C} \quad (28)$$

donde n_D , n_F y n_C son los índices de refracción del material a las respectivas longitudes de onda de las líneas de Fraunhofer denominadas F (para 486.1 nm), D (para 587.6 nm) y C (para 656.3 nm), respectivamente. Dado que la diferencia ($n_F - n_C$) dicta la dispersión del material en la ecuación (28) se puede ver que menor número de Abbe mayor DVG del vidrio. La clasificación de los materiales se muestra en la Figura 11 (SCHOTT.inc, 2014) donde las coordenadas (x,y) corresponden al número de Abbe e índice de refracción, respectivamente, por lo que cada material está representado por un punto dentro de la gráfica (ver Figura 11).

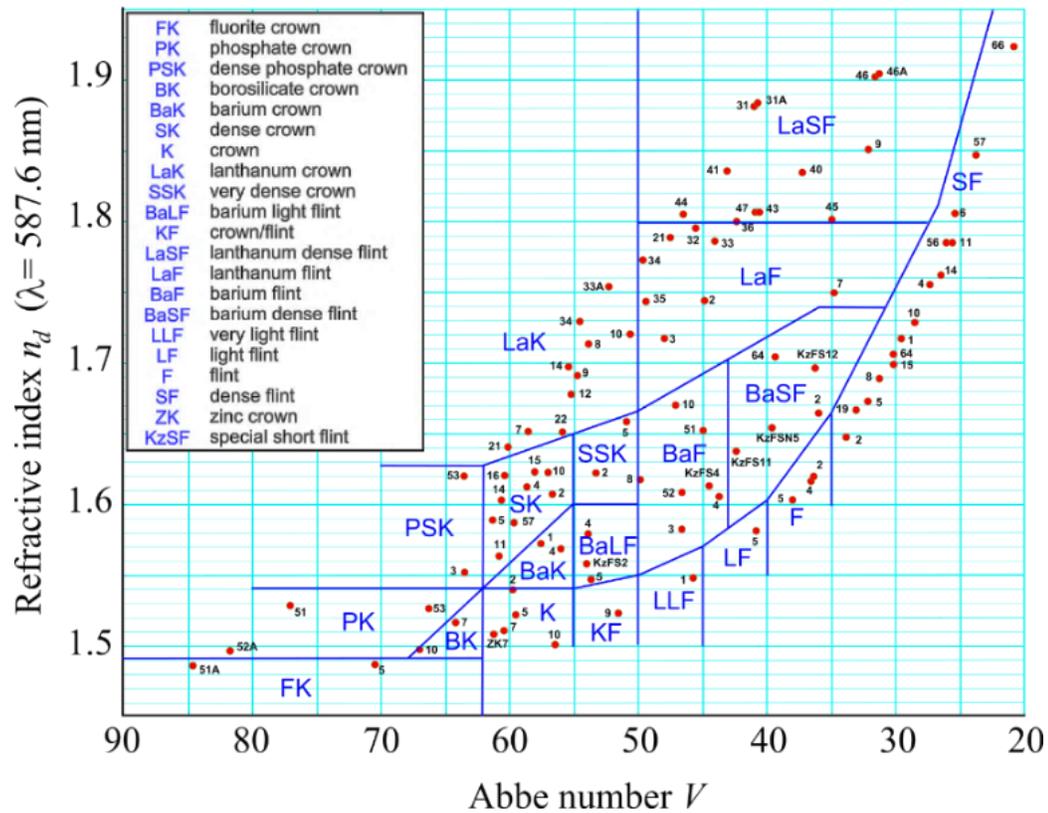


Figura 11. Diagrama de Abbe para la dispersión de vidrios introducido por primera vez por la compañía SCHOTT en 1923: Se muestran los números Abbe y el índice de refracción en diferentes tipos de vidrios. Tomada de (SCHOTT.inc, 2014).

Con el fin de ensanchar los pulsos láser de una manera controlada, en este trabajo de tesis se utilizaron barras de vidrio (“blocks”) SF57 con sección transversal de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ y diferentes longitudes (2, 4 y 8 cm) como las mostradas en la Figura 12. De la Figura 11 se observa que este vidrio posee un índice de refracción de 1.847 (a 530 nm) y un número Abbe bajo de aproximadamente 23.8. Comparado con el vidrio BK7, utilizado típicamente en la fabricación de lentes, cuyo índice de refracción es de 1.517 y número de Abbe de 59.5, el SF57 ofrece una mayor dispersión de velocidad de grupo.

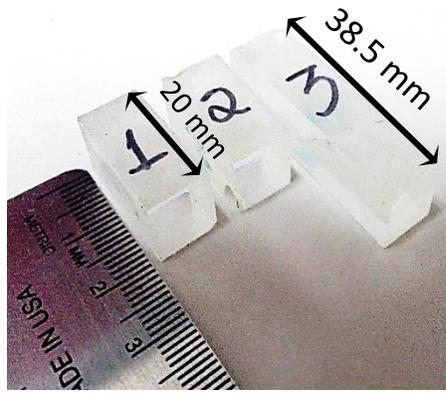


Figura 12. Juego de tres barras de vidrio SF57 fabricadas en CICESE, con superficies de entrada y salida de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ y longitudes de 20mm y 38.5mm utilizadas en el experimento.

3.1.2 Muestras

Para los experimentos se utilizaron dos soluciones solventes: DMSO (Dimetilsulfóxido) y un par de muestras sólidas: el poliestireno y fibras de colágeno. Como se podrá ver más adelante en la sección de resultados, todas ellas muestran bandas Raman intensas que caen en un rango específico de frecuencias de vibración molecular ($180\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$), mismo que puede ser excitado coherentemente mediante la frecuencia de batido de los haces de bombeo y Stokes utilizados en los experimentos.

Tabla 2. Muestras utilizadas el presente trabajo de tesis.

MUESTRA	DMSO (DIMETILSULFÓXIDO)	METANOL	COLÁGENO	POLIESTIRENO
FASE	Líquida	Líquida	Sólida (fibrosa)	Sólida
PROPIEDAD ÓPTICA	Transparente	Transparente	Traslúcida-Difusa	Transparente
PREPARACIÓN	Cubeta de cuarzo	Cubeta de cuarzo	Inmersa en agar al 1%	Oblea de 0.5mm de espesor

La Tabla 2 enlista las muestras utilizadas, su fase (líquidas/sólida), propiedad óptica general y preparación. Para montar las soluciones en el arreglo óptico se utilizó una cubeta de cuarzo. La muestra de colágeno consistió en fibras de colágeno extraídas de colas de ratón las cuales fueron inmersas en gel de agar al 1% con la finalidad de sostener verticalmente la fibra de colágeno. Mientras que la oblea de poliestireno únicamente se fijó en una montura óptica de espejo.

3.2. Equipo Principal

3.2.1 Oscilador Titanio:Zafiro

El equipo principal en esta tesis es un oscilador láser de Titanio:Zafiro que emite pulsos ultracortos por amarre de modos (KML, modelo GRIFFIN). La potencia promedio medida a la salida del oscilador en modo de oscilación es de 250 mW, emitiendo pulsos ultracortos de 120 fs de duración, con una frecuencia de repetición de 82 MHz, un ancho espectral de 110 nm aproximadamente, que cubre un rango de longitudes de onda de 740 nm a 850 nm. Para poder operar el oscilador éste debe ser bombeado ópticamente con un láser de estado sólido bombeado por diodo (Laser Quantum, Opus532) de 6W y 532 nm de longitud de onda.

Este rango espectral ancho se aprovecha para dividirlo ópticamente y con ello obtener los dos haces, de bombeo y Stokes, necesarios para excitar coherentemente rangos vibracionales en las muestras a utilizar.

3.2.2 Espectrofotómetro

Los espectros láser fueron medidos utilizando un espectrofotómetro Stellarnet Black Comet modelo BLK-C-SR con un rango de medición de 380 a 1000 nm, detector CCD de 2048 pixeles, resolución de 0.75 nm y rango dinámico 2000:1 (Stellarnet, 2014). La alta sensibilidad del equipo es la adecuada para capturar espectros con muy baja intensidad (recordando que las señales Raman son muy débiles).

3.2.3 Platina de traslación micrométrica

Para el traslape espacio-temporal de pulsos ultracortos de bombeo y Stokes se utilizó una platina de traslación micrométrica (Newport, Universal Motion Driver ESP300). Este equipo posee un controlador autónomo avanzado con motores integrados alimentados por DC; tiene capacidades de movimiento programado y funciones digitales de I/O (entrada y salida). Si el ancho temporal de los pulsos es de 1ps el espacio que ocupa es de aproximadamente 30 μm . Esta platina tiene funciones de traslación con rangos de velocidades desde 1 $\mu\text{m/s}$ hasta 1mm/s, pudiendo moverse en pasos de 1, 10 o 100 μm con excelente precisión.

3.2.4 Microscopio Raman (Olympus BX41 y láser Dimension-P2 Raman)

Para tener una referencia de dónde existían las bandas Raman en las muestras aquí utilizaron, se tomaron espectros utilizando un equipo micro-Raman comercial (Lambda Solutions, BX41 con láser Dimension-P2 Raman). El cual consta de un láser de onda continua con longitud de onda en 532 nm acoplado a un microscopio vertical (*upright*) incidiendo en modo de transmisión y colectando la señal en reflexión; es decir, el mismo objetivo que enfoca es utilizado para coleccionar la señal Raman. La señal Raman regresa por el mismo camino óptico de la fuente láser y es separada con un espejo dicróico que refleja solamente señales Raman, longitudes de onda > 532nm, seguidos de un filtro Notch 532nm para eliminar señales espurias de la fuente de excitación y finalmente enviar la señal Raman a un espectrómetro para graficar sus componentes espectrales.

3.3 Métodos de medición

3.3.1 Auto-correlación

Ya que no existe foto-detector alguno que sea tan rápido como para una medir directamente la duración de un pulso ultracorto (10^{-12} o 10^{-15} segundos), la medición debe hacerse indirectamente. Para ello se utilizan instrumentos llamados auto-correladores los cuales trabajan bajo un esquema de interferómetro de Michelson. La Figura 13 muestra el esquema del auto-correlador construido en el

laboratorio de óptica de CICESE (García Arthur, 2003). Una explicación detallada y práctica se puede encontrar en la tesis previa a este trabajo de Méndez Pfiffer (Méndez Pfeiffer, 2014), misma que aquí se describe brevemente.

Los pulsos se recombinan haciéndolos interferir en un medio no lineal. El campo de ambos pulsos se traslapa en un material semiconductor de un fotodiodo induciendo un proceso óptico no lineal conocido como un proceso absorción de dos fotones. Dicha absorción se traduce en una señal de corriente que se mide en un osciloscopio marca Tektronix modelo TDS 2024C con frecuencia de muestreo de hasta 200 MHz a 200 GHz por segundo. Graficando entonces la intensidad del proceso no lineal, debido al campo de la interferencia de los pulsos, como función del desfaseamiento entre ellos. Esto da como resultado una traza de intensidad contra tiempo de traslape obteniendo así lo que se conoce como traza de auto-correlación.

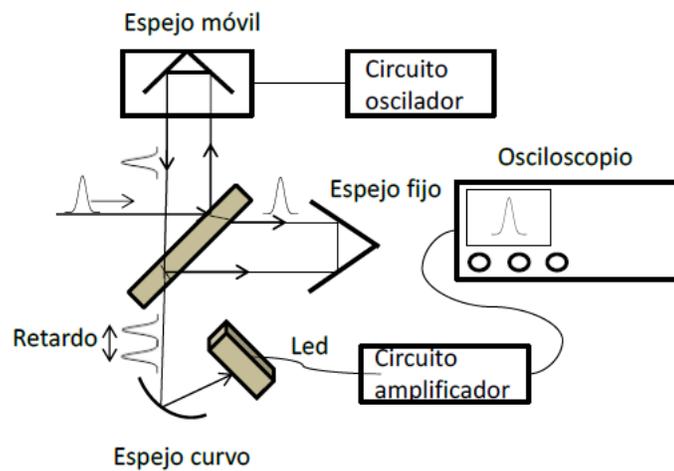


Figura 13. Esquema del auto-correlador por absorción de dos fotones en un LED. Tomada de (García Arthur, 2003).

3.4 Arreglo experimental

La Figura 14 muestra el arreglo utilizado para la obtención de las señales de Raman Coherente. Para explicar su funcionamiento se puede dividir en tres etapas:

- La primera etapa consiste en la obtención de los haces de bombeo y Stokes mediante la división del contenido espectral de los pulsos.

- La segunda etapa consiste en el ensanchamiento de pulsos. Esta etapa se subdivide en dos configuraciones experimentales: la configuración de rendija temporal y la configuración de enfoque espectral.
- La tercera etapa consiste en la generación y detección de los procesos Raman coherentes por medio de la mezcla de ondas.

3.4.1. Obtención de haces de bombeo y Stokes

El arreglo experimental empieza con el tren de pulsos ultra cortos emitidos por el láser de Titanio:Zafiro. En los experimentos la potencia de salida, la frecuencia de repetición y el ancho temporal son de 250mw, 76 MHz y 120fs, respectivamente. El ancho espectral típico a la salida del oscilador se muestra en el espectro de la derecha insertado en la Figura 14. El haz de luz de estos pulsos es guiado por espejos hacia un cubo polarizador, PBS (PBS102, Thorlabs) cuya característica principal es transmitir luz con polarización \hat{p} (lineal horizontal) y reflejar luz con polarización \hat{s} (lineal vertical). De allí que el uso de una placa retardadora acromática de $\lambda/2$ (AHWP05M-980, Thorlabs) antes de incidir sobre el cubo polarizador sirve por un lado para controlar una trasmisión eficiente de la potencia del haz y, por otro lado, para variar la potencia en el experimento siguiendo la ley de Malus.

Posteriormente, el haz pasa por una placa retardadora acromática $\lambda/4$ (AQWP05M-980, Thorlabs) cuyo fin es transformar la luz a polarización circular, para continuar su camino hacia un filtro dicroico DBS modelo DMSP805. Este filtro separara el contenido espectral del haz exactamente a 800nm tal y como se aprecia en los espectros en la parte superior derecha de la Figura 14. Con esto se generan dos haces, uno por cada brazo del interferómetro, uno con un espectro que va de 750nm a 780nm, aproximadamente, el cual se denomina haz de bombeo, y otro espectro que va de 800nm a 850 nm, aproximadamente, denominado haz Stokes. Nótese que la división espectral se da en dos pasos realmente, ya que los haces son reflejados hacia el DBS nuevamente. Para traslapar ambos haces espacial y temporalmente, el espejo que refleja el haz Stokes se monta sobre la platina traslacional.

3.4.2. Ensanchamiento de pulsos: Configuración de **Rendija** Temporal

Esta configuración consiste en ensanchar temporalmente sólo uno de los dos haces excitantes. Idealmente se ensancha únicamente el haz de Stokes, sin embargo, debido que existen otros elementos dispersivos en el arreglo experimental, se busca tener la condición $\beta_b \ll \beta_S$ (ver Figura 10). Para lograr esto, volviendo al arreglo experimental, se coloca un bloque vidrio dispersivo SF57 de 4cm, justo después de ser reflejado el haz Stokes del DBS (ver Figura 14), y al ser reflejado por el espejo vuelve a pasar por el mismo bloque para producir ensanchamiento temporal a lo largo de 8cm de vidrio dispersivo. La finalidad de colocar el vidrio en un solo brazo es inducir una diferencia de frecuencias múltiple, en donde una sola componente de frecuencia Stokes, ω_s , interactúe con todas las n -frecuencias del haz de bombeo, $\omega_{b,n}$, de modo que se exciten n -diferencias de frecuencias de la forma $\omega_{v,k} = \sum_{k=0}^n \omega_{b,k} - \omega_s$. El esquema de esta diferencia fue descrito en la Figura 10c y recibe el nombre de “**rendija** temporal” puesto que el haz “sin chirp” (o con menor chirp) funciona como una **rendija** que escanea diferentes frecuencias Stokes según sean trasladados dentro del haz con mayor ancho temporal.

Realizado el ajuste en el arreglo, se procedió a la colocación de las muestras de interés entre el juego de objetivos de microscopio con el fin de que los haces trasladados atraviesen la muestra estando enfocados con ayuda del objetivo OBJ 1. La función del objetivo OBJ 2 es la de colimar el haz nuevamente para facilitar la colección, en transmisión, usando un espectrofotómetro.

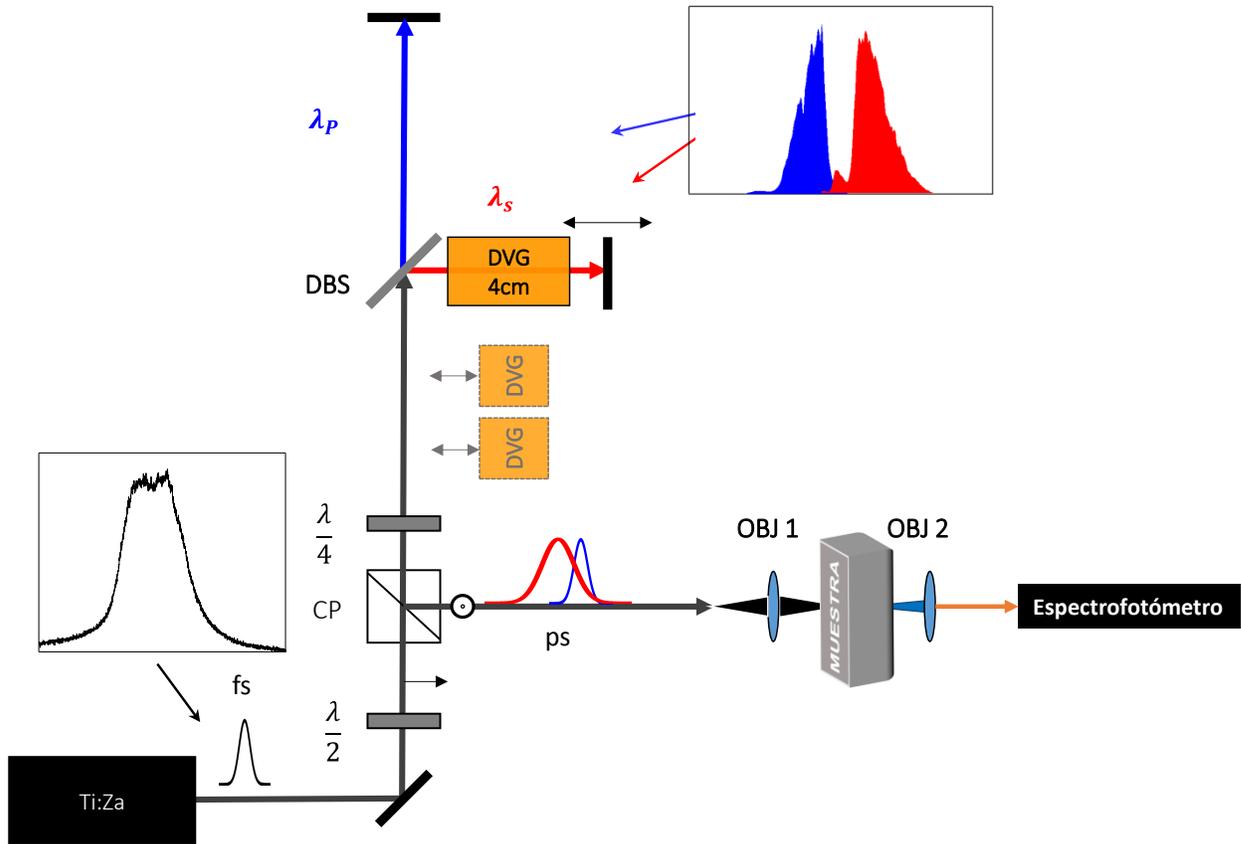


Figura 14. Arreglo experimental.

3.4.3. Ensanchamiento de pulsos: Configuración para Enfoque Espectral

Esta configuración consiste en ensanchar temporalmente dos haces excitantes. Se busca que ambos tengan la misma cantidad de chirp, $\beta_b = \beta_s$, lo cual se logra calculando la razón de las longitudes de vidrio $L_S/L_b \approx 1.3$ según (Rocha-Mendoza, Langbein, & Borri, Coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing with glass dispersion, 2008). Para lograr esto es necesario agregar más bloques al arreglo experimental, estos se esquematizan en la Figura 14 justo antes de ser divididos los haces (antes del DBS). Debido a que existe una reflexión debe considerarse en esta razón el doble de la longitud según la cantidad de vidrio que se obtenga, en este experimento por ejemplo se empleó una longitud total de 17.35 cm para el haz Stokes y 17.5 cm para el haz de bombeo respectivamente. Como ya se ha mencionado, la finalidad introducir el mismo *chirp* en ambos haces es que al momento en que se traslapen tengan una diferencia de frecuencias constante, pero dependiente del tiempo, esto se puede deducir de la Figura 10b.

3.4.4 Obtención de espectros CARS / Raman Coherente

Una vez que se obtienen los haces de bombeo y Stokes y se induce el respectivo ensanchamiento temporal, según sea el caso, éstos son reflejados nuevamente hacia el cubo polarizador, CBS, pasando previamente por la placa retardadora acromática $\lambda/4$ para transformar la polarización circular en polarización lineal vertical \hat{s} y con ello poder reflejar eficientemente los haces hacia el juego de objetivos de microscopio. Aquí la función del primer objetivo es enfocar los haces de bombeo y Stokes en la muestra para inducir la mezcla de ondas y con ello los procesos Raman. El segundo objetivo, colecta las señales generadas y se envían a al espectrofotómetro.

Usando la placa micrométrica traslacional, sobre la cual está montado el espejo del brazo-Stokes, se inicia un movimiento fino y constante en pasos de 30 $\mu\text{m}/\text{seg}$. La placa tiene la capacidad de moverse en un plano, hacia atrás o adelante según se desee. Desde una posición inicial de cero, se traslada el espejo hacia una posición deseada lo que provocará que el espectro Stokes se traslape con el espectro de bombeo, con lo cual se consigue el efecto del enfoque espectral en el interior de la muestra. Con ello toda señal generada se colima nuevamente con la lente-objetivo a la salida el haz de la muestra. El espectro fundamental y el generado por los haces traslapados se colectan con el espectrofotómetro, se exportan como archivos crudos vía SpectraWiz y se grafican en el software Origin.

Capítulo 4. Resultados y discusiones

En éste capítulo se muestran los resultados más relevantes obtenidos durante el presente proyecto de maestría, mismos que se discuten al ir exponiéndolos en el texto. El capítulo inicia con la presentación de los espectros Raman de las muestras utilizadas. Posteriormente, se muestra la forma en que se extrajeron las señales Raman coherente y estimulado partiendo de los datos tomados “en crudo”. De allí se divide la exposición de los resultados obtenidos mostrando primero los resultados con la configuración experimental para **rendija** temporal y, finalmente, mostrando los resultados obtenidos con la configuración de enfoque espectral respectivamente.

4.1 Espectros Raman de las muestras

La Figura 15 muestra los espectros Raman de dos soluciones solventes: el dimetilsulfóxido ((CH₃)₂SO) comúnmente conocido como DMSO y el metanol (CH₃OH); y dos muestras sólidas el poliestireno (formado por cadenas (C₈H₈)_n) y fibras de colágeno tipo II (formados por cadenas de tres aminoácidos (Gly-Pro-Hyp)₃), respectivamente. Los espectros se grafican en función de la frecuencia de vibración (expresada en número de onda: cm⁻¹) de las moléculas que lo conforman. Los espectros fueron obtenidos con el microscopio comercial descrito en el capítulo de metodología experimental. Estos espectros se utilizan como referencia en la discusión de los resultados.

Se pueden observar picos Raman en todo el rango mostrado (200-1400 cm⁻¹), en particular los picos correspondientes a las muestras de DMSO y poliestireno, así como, en menor medida, en el metanol y colágeno. La Tabla 3 resume de manera numérica los picos Raman característicos para cada muestra caracterizada en DMSO por ejemplo, (ver la curva color “*aqua*”), la bandas espectrales de intensidad media (*m*) en 308, 336 y 383 cm⁻¹, aproximadamente, corresponden a picos de energías de vibración de flexión (“*bending*”) de los enlaces C-S-C (carbono-azufre-carbono) y de flexión anti-simétrica y simétrica de los enlaces C-S-O (carbono-azufre-oxígeno), respectivamente; mientras que las bandas de intensidad alta (*a*) y media (*m*) en 668 y 700 cm⁻¹, corresponden energías de vibración de tensión simétrica (“*symmetric stretch*”) y anti-simétrica del enlace C-S (carbono-azufre), respectivamente (Selvrajan, 1966). Por su parte, para Metanol, la banda espectral de intensidad alta (*a*) 1035cm⁻¹ se deben a las vibraciones de tensión simétrica por el enlace C-O (carbono – oxígeno), luego en las bandas de 121, 485 y 662 cm⁻¹ con intensidad media (*m*) se tienen vibraciones de flexión en los enlaces, también

de C-O de acuerdo a (Lawrence K. Iwaki, 2000). Para el colágeno, se tiene un pico con intensidad baja (b) en el rango del láser en 1096 cm^{-1} con vibración de tensión asimétrica con el enlace C-O-C y otro pico difícil de especificar ya que, debido a los diferentes tipos de colágeno existentes y, debido a que el pico obtenido es muy bajo en intensidad (b), se estableció un rango desde los 490 a los 811 cm^{-1} con diversas vibraciones, entre ellas están la de deflexión en C-O-C y C-C-N, la de vibración de tensión simétrica en C-O-C, de acuerdo a (Maria Jastrzebska, 2003). La asignación de los picos Raman del poliestireno pueden encontrarse en (Anema, Brolo, Felten, & Bittencurt, 2010).

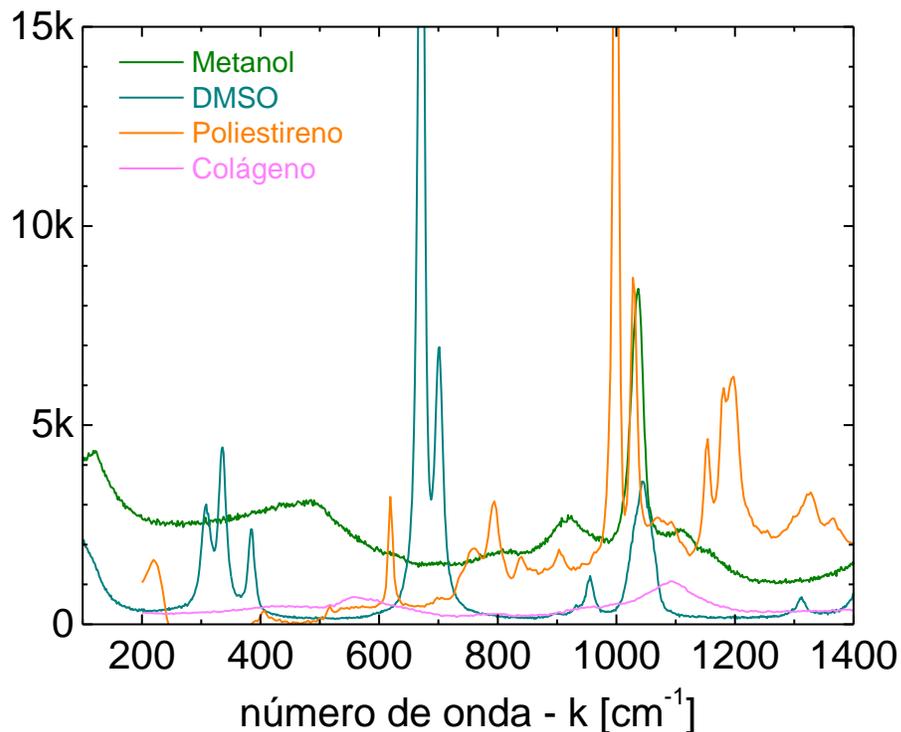


Figura 15. Espectros de las muestras utilizadas en el experimento caracterizados con microscopio Raman

Como se podrá ver más adelante con esta información espectral, y la correspondiente a la información espectral del láser de pulsos ultracortos, se calculó el rango de frecuencias con el que se pueden realizar mediciones de Raman coherente; siendo el motivo principal el espectro de longitudes del cual el láser pulsa y su capacidad de sintonización y ancho espectral máximo sin comprometer la estabilidad de la cavidad oscilante y su potencia de salida (cuestiones que se discutirán en el siguiente

apartado). Nótese que, entre más grande sean los picos en la muestra deseada, más fácil será excitar la frecuencia vibracional con los haces de bombeo y Stokes que se obtienen en el arreglo.

Tabla 3. Frecuencias vibracionales más significativas de las muestras utilizadas en el trabajo experimental.

	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5
Poliestireno	(m) 619cm^{-1}	(m) 794cm^{-1}	(a) 1000cm^{-1}	(a) 1028cm^{-1}	(m) 1198cm^{-1}
Metanol	(m) 121cm^{-1}	(m) 485cm^{-1}	(m) 921cm^{-1}	(a) 1035cm^{-1}	N.A.
DMSO	(m) 308cm^{-1}	(m) 336cm^{-1}	(m) 383cm^{-1}	(a) 700cm^{-1}	(m) 1045cm^{-1}
Colágeno	N.A.	N.A.	N.A.	(b) 557cm^{-1}	(b) 1096cm^{-1}

Guía de picos de intensidad: alto(a), medio(m) y bajo(b)

Debido a las características de emisión espectral de los haces de bombeo y Stokes, se eligió trabajar en el rango de 300 a 400cm^{-1} del DMSO en el cual se observan tres picos Raman 308 , 336 y 383cm^{-1} . Estos resultaron ser una triada de picos vibracionales adecuada para realizar los experimentos debido a que, aparte de que se encuentran en el rango de emisión óptima de los haces (no se sacrifica potencia de los haces), la diferencia de frecuencia del bombeo y Stokes también es la óptima para excitar este rango de vibraciones. El resto de los picos quedaban superiores a los 400cm^{-1} quedan fuera de la diferencia de frecuencia, o bien, de excitar una frecuencia vibracional, las potencias espectrales eran mínimas, cayendo en las colas de los espectros de bombeo y/o Stokes. Cabe mencionar que el colágeno no mostró frecuencias vibracionales medias o altas de intensidad en este rango y, por lo tanto, se descartó su uso en el experimento.

4.2 Ensanchamiento de pulsos y espectros obtenidos

La Figura 16 muestra el ancho temporal obtenido para cada una de las configuraciones experimentales. Para el caso de la configuración de rendija temporal el bombeo tiene un ancho temporal de 0.182ps (picosegundos) y el Stokes de 0.765ps , respectivamente (ver Figura 16a). Mientras que para la configuración de *enfoque espectral* (Figura 16b) estos haces tienen anchos temporales de 0.391 y 0.733ps , respectivamente.

Nótese que para ambas configuraciones experimentales no se logra el caso ideal, esto es, para la rendija temporal el haz de bombeo en principio debe mantenerse limitado en transformada (cercano a los 88 fs, según lo especificado por el proveedor del láser), pero debido a la dispersión natural del vidrio de los elementos ópticos, el haz de bombeo se ensancha a 182fs. Por lo tanto, en esta configuración se buscó que el ancho temporal del Stokes fuera lo más grande posible introduciendo los vidrios de alta DVG únicamente en su camino óptico (sin comprometer la intensidad del haz mismo debido a la absorción y reflectancia del vidrio DVG) logrando un ensanchamiento de 765fs, esto es, 4.2 veces mayor que el haz de bombeo. Por otro lado, para el caso ideal del *enfoque espectral*, ambos haces deben tener el mismo chirp para tener como resultado una diferencia de frecuencias constante entre la interacción de ambos haces (al traslaparse e incidir a través de la muestra); y con ello lograr una buena resolución espectral para, así, resolver las bandas Raman. Aquí se calculó la razón de la longitud vidrios necesarios para obtener el mismo *chirp*, tal y como se describe en (Rocha-Mendoza I. L., 2008). Un indicativo experimental para que el *chirp* fuera igual es medir el ancho temporal en ambos haces y procurar que sea lo más cercano posible. No obstante, se tuvo como resultado una razón de 1.8 en el ensanchamiento temporal del haz de Stokes con respecto al haz de bombeo.

Estas discrepancias en los resultados pueden deberse a que en teoría ambos haces deben estar inicialmente limitados en transformada. Esto estrictamente no se cumple en este experimento ya que los haces son resultado de una división espectral y no provienen de resonadores ópticos separados. Por lo tanto, las condiciones iniciales de ensanchamiento temporal son diferentes reflejándose en los resultados.

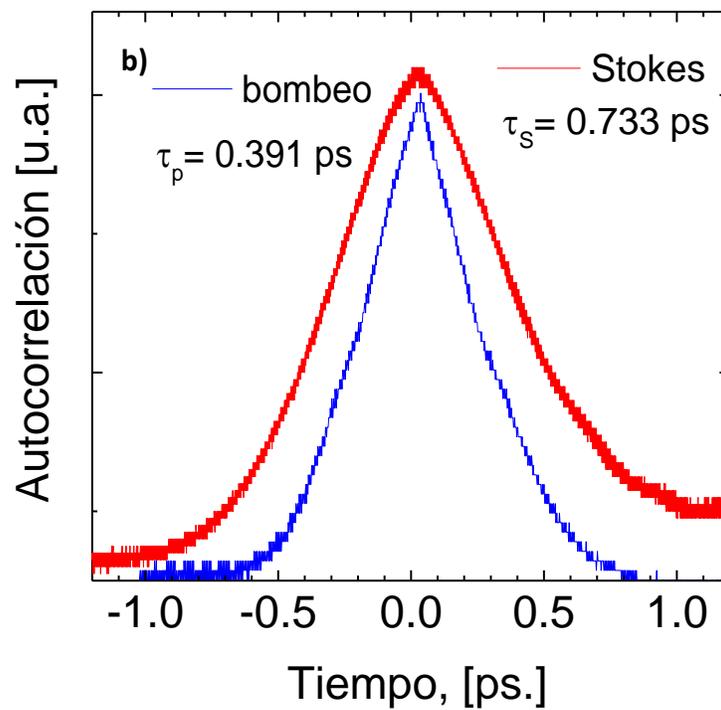
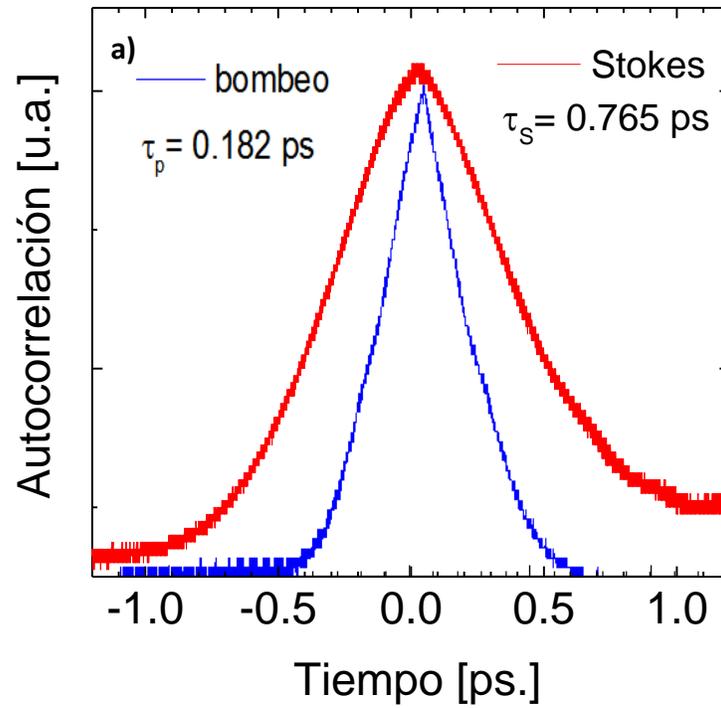


Figura 16. Caracterización temporal de los haces de bombeo y Stokes para dos configuraciones: a) es para el caso de la rendija temporal, y b) corresponde a la configuración de enfoque espectral.

La Figura 17 muestra un ejemplo del espectro del oscilador láser antes y después de ser dividido. Nótese que la división espectral está forzada a ocurrir en 800 nm como consecuencia del doble paso por el filtro dicróico, mismo que es utilizado en ambas configuraciones experimentales. Note también que el viaje de la luz a través de vidrio no genera efectos ópticos no lineales que inducen nuevas frecuencias ópticas. La curva en color negro es el espectro del haz fundamental; es decir, el espectro de emisión del láser de Titanio: Zafiro en modo oscilante (indicando la emisión pulsada). En este ejemplo el ancho espectral que se observa es de aproximadamente 60nm, sin embargo, hay que mencionar que el ancho espectral que se utilizó finalmente en los experimentos fue de aproximadamente 70 nm. Los espectros resultantes de esta división óptica pasiva se muestran en color azul y rojo, estas representan las señales de bombeo y Stokes, respectivamente. En la figura es posible observar que el ancho espectral del haz de bombeo es de 20 nm con un pico de intensidad en 781nm, mientras que el haz de Stokes tiene un ancho de 30 nm y un pico en 813nm.

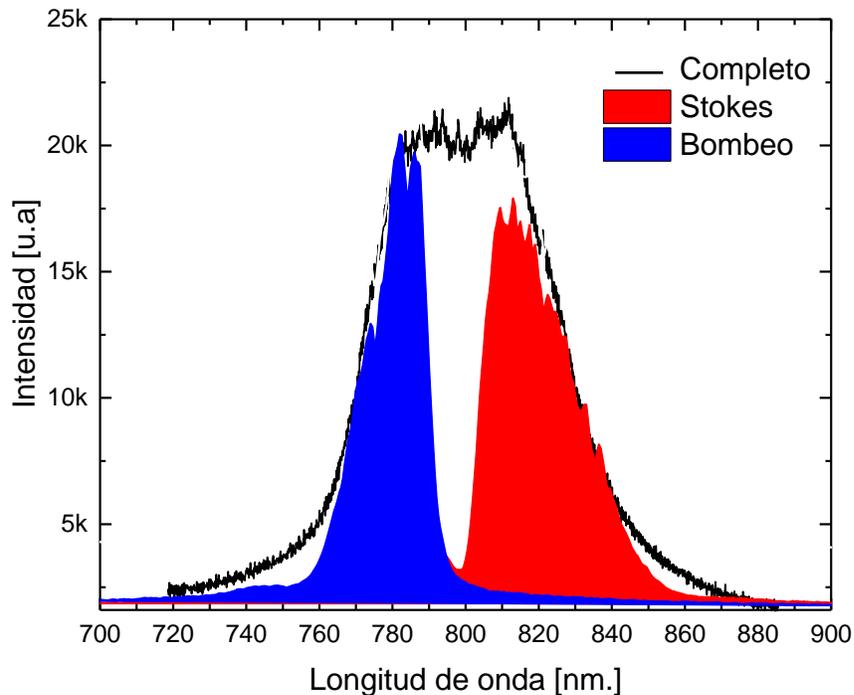


Figura 17. Espectro de emisión de láser utilizado en el experimento. Al pasar por el arreglo, dicho espectro se divide gracias a un espejo dicróico que corta en 800 nm y con ello se consiguen los haces de bombeo (azul) y Stokes (rojo).

No está de más aclarar que estos gráficos solamente muestra caracterización espectral de los pulsos y no involucran el uso de alguna muestra en cuestión; es decir, éstos resultados se obtuvieron antes de que los haces interactúen entre sí dentro de las muestras. En la siguiente sección se mostrarán los resultados correspondientes a la interacción con las muestras y a la obtención de señales Raman coherentes.

4.3 Extracción de señales Raman coherentes

Puesto que ambas configuraciones experimentales (*rendija temporal* y *enfoque espectral*) no resultaron experimentalmente ideales para la obtención respectiva de espectros Raman multiplexados y con resolución espectral, era de esperarse la obtención de espectros con múltiples picos Raman y poca resolución espectral. En efecto, como se mostrará más adelante en este mismo apartado, los experimentos en la mezcla de ondas dieron como resultado señales Raman coherentes con varios picos de frecuencias (medidas a través de su longitud de onda) que pueden ser asignadas a una misma resonancia molecular, pero excitados con un par de ondas bombeo-Stokes diferente. Es decir, una misma vibración molecular puede ser excitada con una sección diferente dentro del contenido espectral de cada pulso de los espectros de bombeo y Stokes (ver Figura 17). Esto además del hecho que las señales espectrales resultantes están “montadas” sobre las mismas señales incidentes, para el caso de SRL y SRG, respectivamente. En este contexto, tener una metodología para extraer y analizar las señales Raman coherente es de suma importancia.

La metodología para extraer los espectros fue mediante la obtención de espectros con y sin la muestra, y posteriormente se grafica la diferencia entre estos espectros. Este procedimiento se realiza para diferentes posiciones de traslape espacio-temporal de los haces. La Figura 18 muestra el resultado de la diferencia de espectros para varias posiciones de traslape con pasos de 0.05 mm (50 micrómetros). El traslape se logra con la platina transnacional desplazando el haz Stokes (con la ayuda de un espejo) a lo largo de un eje z en la dirección de propagación, el pulso del haz Stokes se acerca o se aleja del su traslape con el haz de bombeo. En la figura se muestran 26 pasos (por tanto 26 espectros) de los cuales destacan al menos 5 señales con diversos picos significativos (0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95 mm) contenidos en un rango de longitudes de onda similares entre sí, los cuales corresponden al ancho total que proporciona el espectro del láser. En dichos espectros se encuentran las señales Raman coherentes y para estudiarlos se procedió a un análisis con más detalle mostrado a continuación.

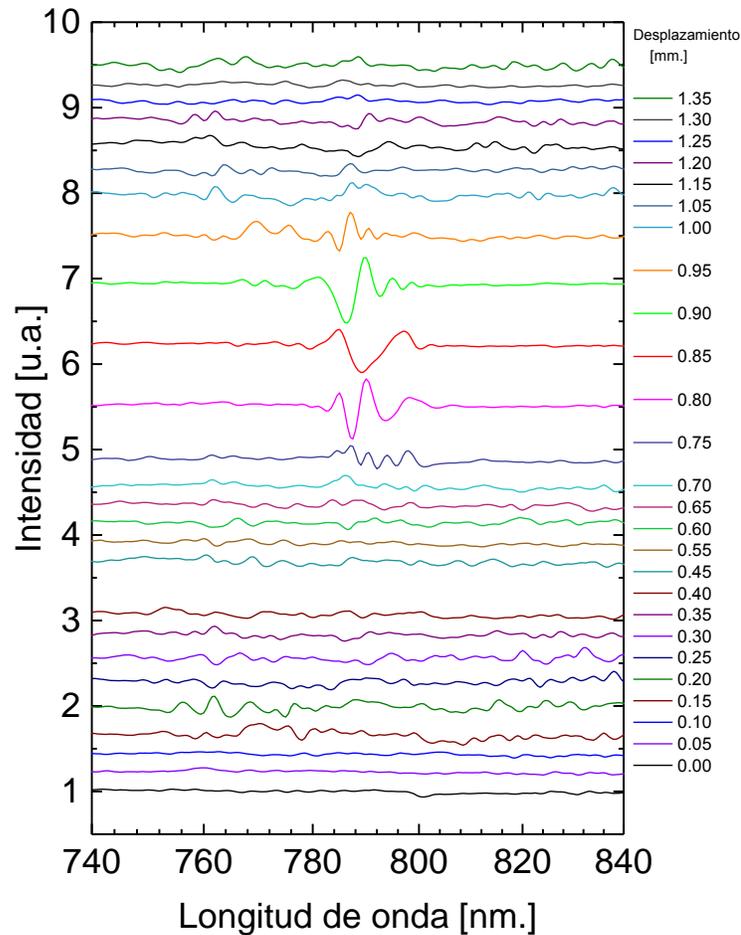


Figura 18. Espectros Raman coherente DMSO como dependencia del traslape espacio temporal de pulsos. **El desplazamiento es el retraso entre pulsos.**

La Figura 19 muestra una idea más clara del procedimiento de análisis para un caso particular. En la Figura 19a, la curva (A) de color verde es la señal Raman coherente detectada, es decir, resultante de la mezcla de ondas de los haces traslapados en la muestra; mientras que la curva (B) de color negro es la señal-suma de los haces Stokes y bombeo capturados individualmente. Siendo más específico, se capturaron los espectros de bombeo y Stokes de manera individual y la curva negra es la suma de ellos. Esto es necesario puesto que en las zonas de traslape el espectrofotómetro suma las intensidades, y al realizar la diferencia con respecto a la señal esta intensidad sumada tiene que ser considerada. Haciendo una comparación directa de la curva (A) respecto a la curva (B), es posible notar zonas en que la señal (A) es menor y otras zonas donde la señal aumenta. Estos cambios se deben al acoplamiento entre los haces de bombeo y Stokes que ocurre cuando la diferencia de frecuencias ópticas es tal que excitan

coherentemente frecuencias moleculares. Nótese, además, que dichos cambios de intensidad están montados sobre los espectros de los haces fundamentales, y en primera aproximación dan la impresión de ser picos de intensidad.

La Figura 19b grafica la diferencia (A)-(B) donde se aprecian mejor los picos de intensidad inducidos por la interacción molecular de la muestra con solución de DMSO. A *partir de ahora*, a los gráficos de la diferencia (A)-(B) se les denominará *espectros Raman coherente o Raman estimulado de manera indistinta*. Las zonas espectrales en que el espectro Raman estimulado es cero, indican que la interacción de las frecuencias ópticas (expresadas aquí mediante su longitud onda) no excita ninguna frecuencia molecular. Mientras que las zonas en que el espectro Raman estimulado es diferente de cero, indica que los haces bombeo y Stokes interactúan mediante un acoplamiento molecular, que ocurre cuando la diferencia de frecuencias ópticas de estos haces está en resonancia con la frecuencia de oscilación de la molécula. Es decir, la frecuencia de batido de las ondas interactuantes excita coherentemente la frecuencia de oscilación de la molécula y esta a su vez modula la intensidad de los haces de bombeo y Stokes existiendo una pérdida o ganancia de energía. A estas pérdidas o ganancias de energía se les conoce como perdidas Raman (Raman Loss) y ganancias Raman (Raman Gain), respectivamente.

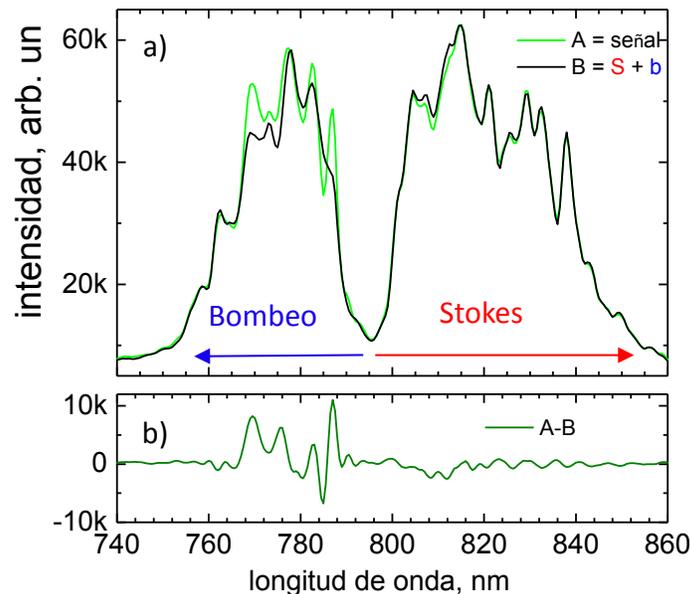


Figura 19. Obtención de espectros Raman coherente. a) Señal obtenida (curva verde) en dimetilsulfoxido (DMSO) y espectro inicial (curva negra) correspondiente a la suma de los espectros Stokes y bombeo. b) Espectro Raman coherente, se obtiene realizando la diferencia entre la señal obtenida y la suma de espectros mostrados en (a).

4.4 Resultados con la configuración de rendija temporal

Basados en la metodología para la obtención de espectros Raman coherente explicados en la sección anterior, se muestran ahora los resultados obtenidos con el arreglo experimental configurado en *rendija temporal*; esto es, en el cual se colocó un solo vidrio DVG de 4 cm en el camino óptico del haz de Stokes y se dejó libre el haz de bombeo. Recordemos que la rendija temporal necesita de un solo haz con chirp (vidrio DVG) y otro haz sin chirp para producir un espectro múltiple capaz de resolver espectros vibracionales que estén hasta una distancia 20 cm^{-1} uno del otro. Con dicha configuración se obtuvieron los resultados críticos del trabajo de tesis obteniendo, conjuntamente, espectros SRS (SR-G y SR-L) y señal CARS.

Cabe resaltar que los resultados mostrados a continuación corresponden únicamente al DMSO por ser la muestra que presenta picos espectrales en el rango de $300\text{ a }600\text{ cm}^{-1}$ que pueden ser excitados de manera eficiente con el contenido espectral de los haces de bombeo y Stokes.

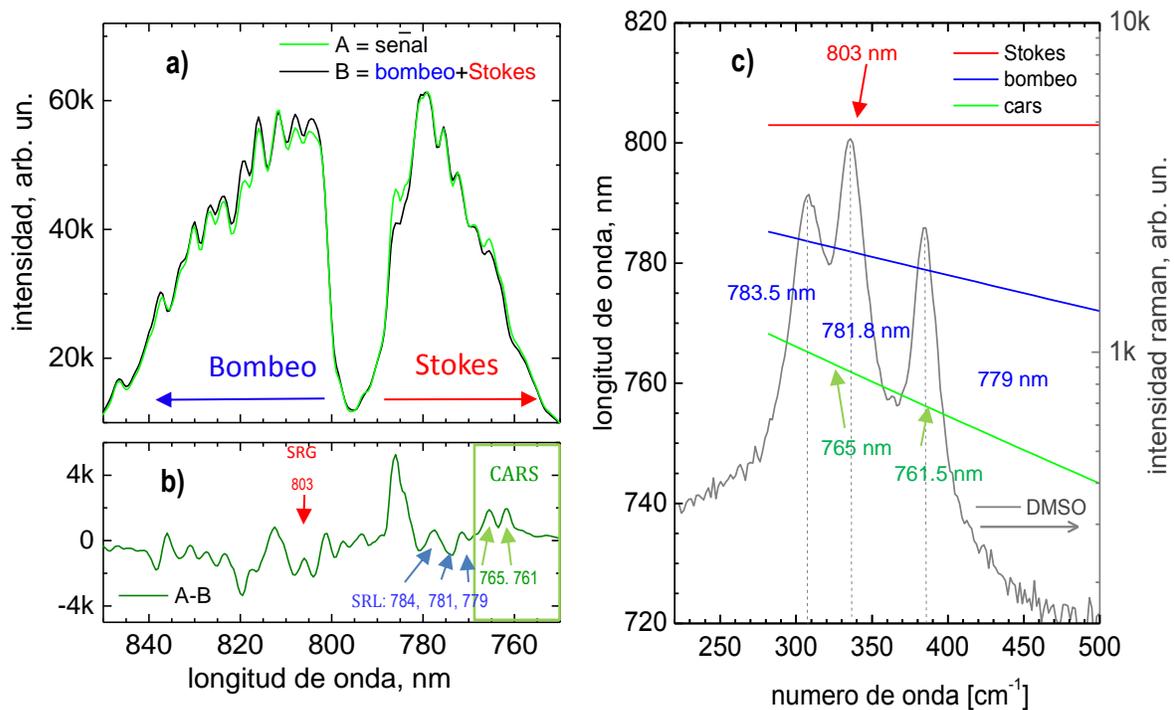


Figura 20. Procesos Raman coherente (0.75 mm) en DMSO. a) Señales Raman (verde) y suma de espectros de bombeo y Stokes; b) extracción de señales Raman por medio de la diferencia de las curvas mostradas en (a); c) espectro Raman del DMSO y estimación de señales CARS, SRG y SRL. Las flechas rojas, azules y verdes indican las longitudes de onda SRG, SRL y CARS, respectivamente. Para la estimación el rango de longitudes de onda del bombeo es de 778-785nm con 803nm en el Stokes.

La Figura 20a muestra nuevamente los espectros señal (curva A) y de la suma de espectros incidentes (curva B), mientras que la Figura 20b muestra el espectro Raman estimulado resultante. Nótese que a diferencia de la Figura 19, en esta figura se invierte la escala de las longitudes de onda para mejor comparación con el espectro Raman espontáneo, ya que el número de onda es inversamente proporcional a la longitud de onda. En este último se indica un ejemplo particular de la interacción de una frecuencia óptica Stokes (haz con *chirp*) con diferentes frecuencias de bombeo (haz sin *chirp*) contenidas en la rendija temporal. La flecha roja indica la longitud de onda a 803nm correspondiente a una frecuencia del haz Stokes que experimenta ganancia Raman SRG (justo en el rango espectral del haz Stokes), mientras que las flechas azules indican las longitudes de onda 779, 781 y 784 nm correspondientes a las frecuencias de bombeo que interactúan con dicha frecuencia Stokes y experimentan pérdidas Raman, SRL (justo en el rango espectral del haz de bombeo). Asimismo, las flechas verdes indican los picos espectrales 765.1 y 765.5nm correspondientes a las ondas anti-Stokes coherente (CARS) resultantes de la misma excitación molecular inducida por la interacción de los haces dentro del DMSO.

A manera de comprobar que los picos de ganancia y pérdida observados en la **Figura 20b** corresponden a interacciones Raman coherentes, la Figura 20c muestra el resultado de estimar las longitudes de onda de la señal CARS descrita en el capítulo III en donde, mediante el uso de la ecuación (9), también es posible calcular las frecuencias vibracionales que son excitadas con la interacción entre la onda Stokes a 803 nm (curva Roja) y el rango de ondas de bombeo en el rango de 770 a 785nm. Con la ayuda del espectro Raman espontáneo del DMSO, graficado en la misma Figura 20c en rango de interés, y el trazado de líneas verticales (líneas punteadas en color gris) es posible encontrar las respectivas longitudes de onda que interactúan entre sí para excitar una frecuencia molecular. Por ejemplo, siguiendo la primera línea vertical (de izquierda a derecha) se deduce que la frecuencia vibracional 308.9cm^{-1} resulta de la interacción de los haces de bombeo y Stokes con longitudes de onda 783.5 nm y 803 nm, respectivamente. Mientras que siguiendo la segunda línea vertical se observa que la frecuencia vibracional 336.4 cm^{-1} es resultado de la interacción las longitudes de onda 781.8 nm y 803 nm, respectivamente. Y haciendo lo mismo con la frecuencia vibracional 382.3 cm^{-1} ésta resulta de la interacción entre 779 nm y 803 nm, respectivamente. En la Tabla 4 se resumen las longitudes de onda teóricas y experimentales, donde se puede ver una buena concordancia con las longitudes de onda experimentales.

Tabla 4. Cálculos teóricos y experimentales del proceso Raman coherente del conjunto de espectros de la **Figura 20** en donde se aprecian ligeros corrimientos al asignar los valores teóricos con los experimentales tomados por el espectrofotómetro.

K (cm ⁻¹)	SRG (nm)	SRL (nm)		CARS (nm)	
		Teórica	Experimental	Teórica	Experimental
308.9	803	783.5	781	765	765.5
336.4	803	781.8	781	761.8	761.5
382.3	803	779	781	756.5	NA

En la **Figura 20a** también se pueden distinguir dos picos espectrales de la señal CARS, los cuales según los cálculos de la **Figura 20b** (ver también Tabla 4) estos picos se encuentran en las longitudes de onda de 765.5 nm y 761.5 nm, para las respectivas frecuencias vibracionales 308.9 cm⁻¹ y 336.4 cm⁻¹, respectivamente. Nótese que la frecuencia 382.3 cm⁻¹ no aparece en el espectro CARS y puede deberse a la poca resolución espectral obtenido en el arreglo experimental.

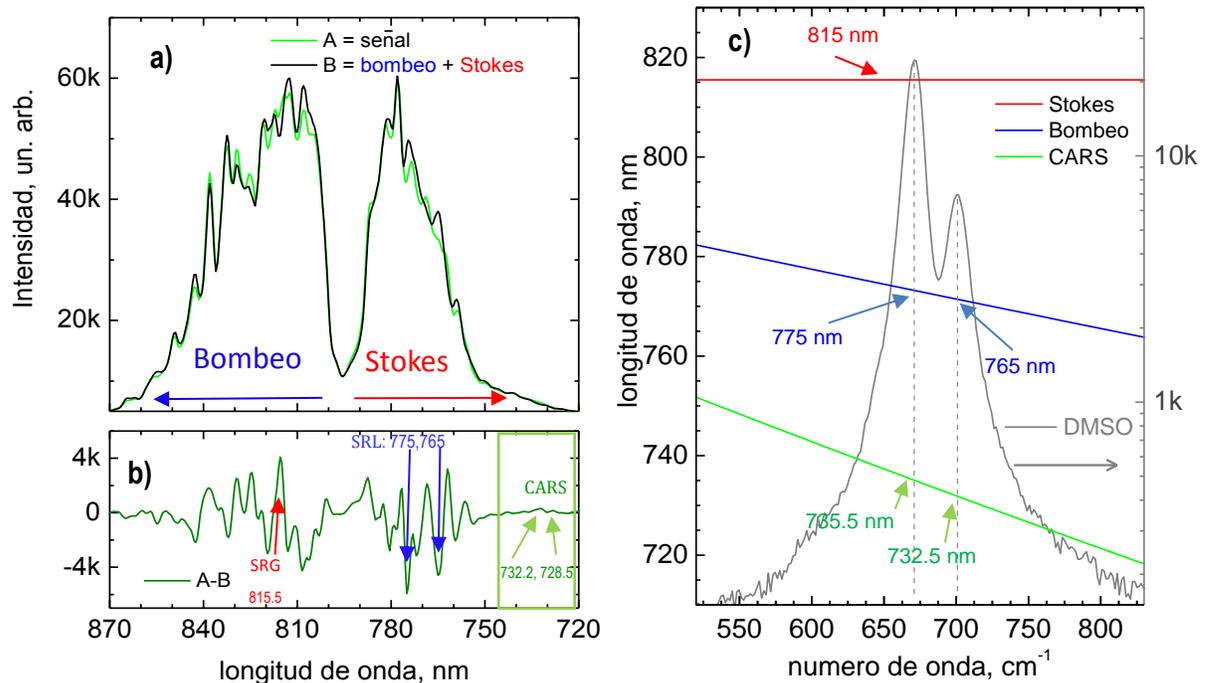


Figura 21. Procesos Raman coherente (0.2 mm) en DMSO. a) Señales Raman (verde) y suma de espectros de bombeo y Stokes; b) extracción de señales Raman por medio de la diferencia de las curvas mostradas en (a); c) espectro Raman del DMSO y estimación de señales CARS, SRG y SRL. Las flechas rojas, azules y verdes indican las longitudes de onda SRG, SRL y CARS, respectivamente. Para la estimación el rango de longitudes de onda del bombeo es de 778-785nm con 815nm en el Stokes.

La Figura 21 muestra otro caso de las señales Raman coherentes obtenidas, pero en una posición de traslape distinta, en 0.2 mm (desplazando el haz Stokes con la platina traslacional). Claramente se puede apreciar un espectro Raman coherente diferente a la Figura 19b. Esto es una consecuencia de mover la zona de traslape entre los haces incidentes dando como resultado la excitación de otras vibraciones moleculares; es decir otra región del espectro Raman como se puede ver en Figura 21c en donde la excitación ocurre en el rango de 550 a 800 cm^{-1} . Similarmente al caso anterior, la Tabla 5 resume las longitudes de onda teóricas y experimentales de la Figura 21 existiendo nuevamente una buena concordancia con las longitudes de onda experimentales. Aquí la frecuencia vibracional 666.2 cm^{-1} resulta de la interacción de los haces de bombeo y Stokes con longitudes de onda 815 nm y 775 nm, respectivamente. Mientras que la frecuencia vibracional 703.7 cm^{-1} es resultado de la interacción de las longitudes de onda 815 nm y 765 nm, respectivamente.

Nótese sin embargo que los picos espectrales de la señal CARS son muy pequeños, pudiéndose incluso confundirse con el ruido propio de la señal y/o como resultado de la diferencia de las curvas A-B en la Figura 21a. No obstante, los cálculos de la Figura 21c (tabulados en la Tabla 5) confirman que estos picos sí corresponden a la señal CARS cayendo en las longitudes de onda de 732.5 nm y 728.5 nm, para las respectivas frecuencias vibracionales 666.2 cm^{-1} y 703.7 cm^{-1} , respectivamente. La baja eficiencia en la generación de estos picos se atribuye a dos posibles casos: por un lado, la zona de traslape de los haces de bombeo y Stokes no es muy eficiente en cuanto su intensidad, esto se puede incluso observar en los efectos de SRL y SRG en la señal Raman de la Figura 21a, es decir, antes de realizar la diferencia. Aquí la señal Raman coherente y la suma de los espectros Bombeo y Stokes es muy similar, indicando también poca eficiencia en el proceso de transferencia de energía entre los haces. Otra posible explicación es una mala eficiencia en la colección de la señal Raman a través de la fibra del espectrofotómetro, ya que experimentalmente esta colección se optimizó para observar los haces de bombeo y Stokes, sin poner realmente mucha atención en la señal CARS.

La Tabla 5 muestra ordenadamente los valores para cada frecuencia vibracional del rango de la muestra.

Tabla 5. Cálculos teóricos y experimentales del proceso Raman coherente del conjunto de espectros de la **Figura 21** en donde se aprecian ligeros corrimientos al asignar los valores teóricos con los experimentales tomados por el espectrofotómetro.

K (cm ⁻¹)	SRG (nm)	SRL (nm)		CARS (nm)	
		Teórica	Experimental	Teórica	Experimental
666.2	815.5	773.5	775	735.5	732.5
703.7	815.5	771.5	765	731.5	728.5

Finalmente, la Figura 22 muestra un tercer caso con otra posición de traslape, pero procurando excitar el mismo rango de frecuencias de la Figura 21, pero en una posición de traslape distinta, en 0.35 mm para este caso (desplazando el haz Stokes con la platina traslacional). Claramente se puede apreciar un espectro Raman coherente diferente a la Figura 22b. Esto es una consecuencia de mover la zona de traslape entre los haces incidentes dando como resultado la excitación de otras vibraciones moleculares; es decir otra región del espectro Raman como se puede ver en Figura 22c en donde la excitación ocurre en el rango de 550 a 800 cm⁻¹. Similarmente al caso anterior, la Tabla 6 resume las longitudes de onda teóricas y experimentales de la Figura 22 existiendo nuevamente una buena concordancia con las longitudes de onda experimentales. Los valores de los números de onda de los picos del DMSO se mantuvieron iguales debido a que se estimó la medición en el mismo rango del espectro vibracional. Aquí la frecuencia vibracional 666.2 cm⁻¹ resulta de la interacción de los haces de bombeo y Stokes con longitudes de onda 815 nm y 772 nm, respectivamente. Mientras que la frecuencia vibracional 703.7 cm⁻¹ es resultado de la interacción las longitudes de onda 815 nm y 769 nm, respectivamente. Se observó que las señales de bombeo utilizadas son distintas a las propias del caso anterior, tanto en la parte teórica (la estimación de señal CARS) como en la adquisición de las señales en el experimento.

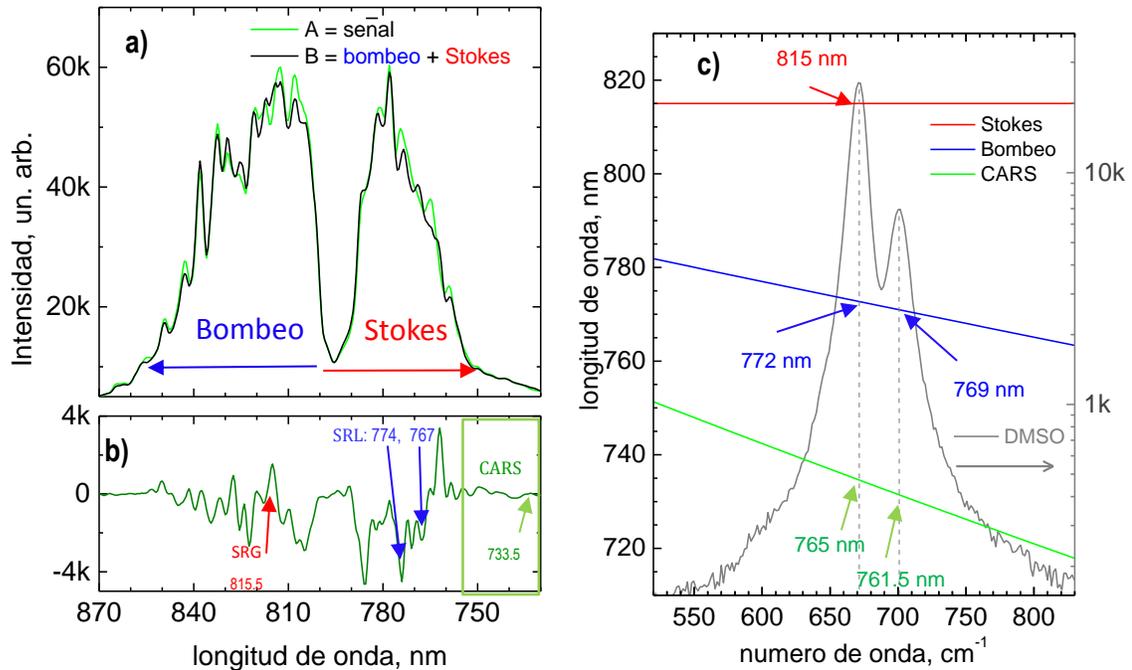


Figura 22. Procesos Raman coherente (0.35 mm) en DMSO. a) Señales Raman (verde) y suma de espectros de bombeo y Stokes; b) extracción de señales Raman por medio de la diferencia de las curvas mostradas en (a); c) espectro Raman del DMSO y estimación de señales CARS, SRG y SRL. Las flechas rojas, azules y verdes indican las longitudes de onda SRG, SRL y CARS, respectivamente. Para la estimación el rango de longitudes de onda del bombeo es de 778-785nm con 815nm en el Stokes.

Nótese que se obtuvo un pico espectral de la señal CARS, nuevamente es muy pequeña en intensidad, pudiéndose incluso confundirse, nuevamente, con el ruido propio de la señal y/o como resultado de la diferencia de las curvas A-B en la Figura 22a. No obstante, los cálculos de la Figura 22c (tabulados en la Tabla 6) confirman que este pico sí corresponde a la señal CARS cayendo en la longitud de onda de 733.5 nm, para las respectivas frecuencias vibracionales 666.2 cm^{-1} y 703.7 cm^{-1} , respectivamente. La baja eficiencia en la generación de este pico se atribuye a dos posibles casos: por un lado, la zona de traslape de los haces de bombeo y Stokes no es muy eficiente en cuanto su intensidad, esto se puede incluso observar en los efectos de SRL y SRG en la señal Raman de la Figura 22a, es decir, antes de realizar la diferencia. Aquí la señal Raman coherente y la suma de los espectros Bombeo y Stokes es muy similar, indicando también poca eficiencia en el proceso de transferencia de energía entre los haces. Otra posible explicación es una mala eficiencia en la colección de la señal Raman a través de la

fibra del espectrofotómetro, ya que experimentalmente esta colección se optimizó para observar los haces de bombeo y Stokes, sin poner realmente mucha atención en la señal CARS.

Tabla 6. Cálculos teóricos y experimentales del proceso Raman coherente del conjunto de espectros de la **Figura 22** en donde se aprecian ligeros corrimientos al asignar los valores teóricos con los experimentales tomados por el espectrofotómetro.

K (cm ⁻¹)	SRG (nm)	SRL (nm)		CARS (nm)	
		Teórica	Experimental	Teórica	Experimental
666.2	815	772	774	733	
703.7	815	769	767	731.5	733.5

De la Figura 22a se puede observar que señal CARS es muy débil, prácticamente nula, y se puede distinguir mediante una pequeña cresta en 733.5 nm, esta longitud de onda cae en un valor intermedio a sus respectivas señales teóricas, 733 y 731.5 nm como se puede apreciar en la Tabla 6. Aquí se denota claramente la falta de resolución espectral conseguida con el arreglo experimental, el cual solamente identificó un espectro CARS de dos picos Raman del DMSO excitados.

4.5 Resultados con la configuración de enfoque espectral

Finalmente, se presentan los resultados obtenidos con la configuración experimental del enfoque espectral ideal para muestras el poliestireno, el metanol y el DMSO.

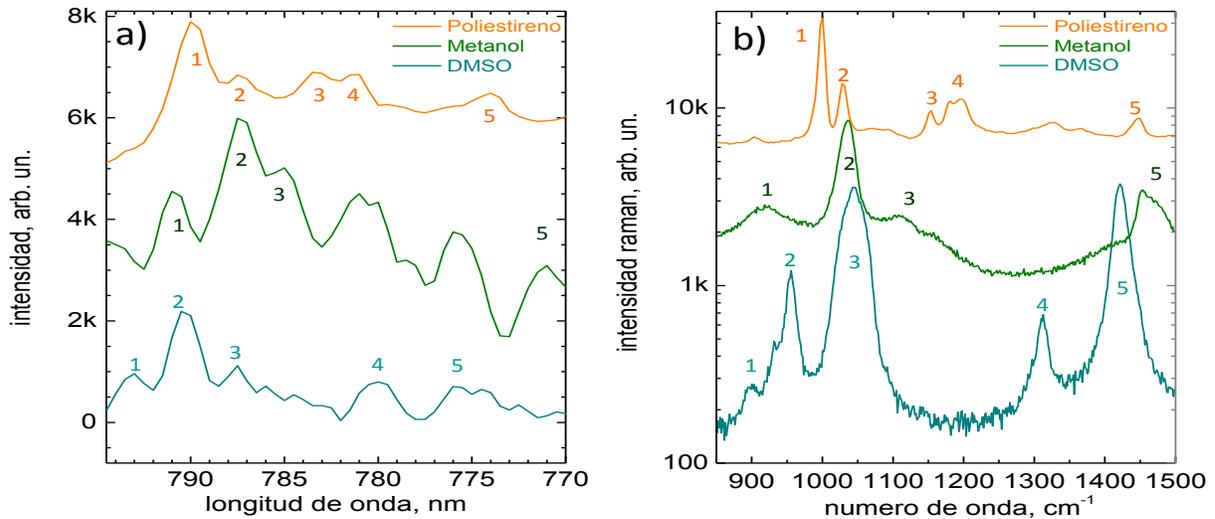


Figura 23. a) Espectros Raman coherente en diferentes muestras obtenidos con el arreglo de enfoque espectral. b) Espectros Raman espontáneo obtenidos con un equipo comercial.

De la Figura 23 se puede apreciar que los resultados del poliestireno son los más coherentes si se analiza la gráfica detenidamente, en resumen, los picos Raman coherentes colectados en la Figura 23a corresponden correctamente al espectro vibracional de la Figura 23b excepto en el ancho espectral, es decir, que debido a la resolución espectral que se consiguió en el arreglo experimental, las bandas vibracionales no fueron excitadas eficientemente, sin embargo, se remarca la dependencia entre la intensidad del haz con la polarización del láser a muestra los respectivos espectros Raman coherentes obtenidos. En este caso la asignación de picos Raman se realiza de manera empírica comparándolos con los espectros Raman espontáneo de la Figura 23b. La Tabla 7 resume y facilita la comparación completa entre los picos. Esta tabla se calcula de manera similar a las anteriores.

Sin duda se puede apreciar una buena concordancia cualitativa de los espectros Raman coherentes y los espectros Raman espontáneos. En particular en el espectro del poliestireno (curva en color naranja) el cual contiene las cinco bandas obtenidas en el espectro Raman espontáneo. Nótese sin embargo que todos los espectros Raman coherentes son más anchos comparados con sus picos vibracionales en todos los casos. Esto confirma que el enfoque espectral no fue el óptimo tal y como se puede apreciar en los picos vibracionales no. 3 y 4 del poliestireno donde existe un ligero traslape entre las bandas en su espectro Raman coherente.

Para el caso del DMSO, sus cinco picos vibracionales también son reproducidos. Solo que el pico vibracional no. 3 del espectro Raman coherente muestra discrepancia en cuanto su intensidad respecto

al espectro Raman espontáneo, el cual muestra un pico de intensidad alta. La razón de este cambio en intensidad se debe a que ciertas frecuencias moleculares dependen fuertemente del estado de polarización del láser, tal y como se demuestra en (Schmidt & Kiefer, 2013), donde la banda en 1143 cm^{-1} (ver Tabla 7) resulta ser altamente dependiente al estado de polarización.

En el caso del metanol (curva en color verde), también existe concordancia, no obstante, se aprecian dos picos espectrales extra entre las frecuencias vibracionales no. 3 y no. 6. Estos picos son producidos muy probablemente por una contaminación con la solución del DMSO, la cual sí presenta esos dos picos espectrales (picos 4 y 5 del DMSO en azul *aqua*). Esta contaminación fue el resultado de no limpiar la cubeta al vaciar la solución de DMSO y verter la solución de metanol. Es por ello que no se le asignó una banda vibracional a éstas señales en la Tabla 7.

Se puede apreciar que los resultados del poliestireno son los más coherentes si se analiza la gráfica detenidamente, en resumen, los picos Raman coherentes colectados en la Figura 23a corresponden correctamente al espectro vibracional de la Figura 23b excepto en el ancho espectral, es decir, que debido a la resolución espectral que se consiguió en el arreglo experimental, las bandas vibracionales no fueron excitadas eficientemente, sin embargo, se remarca la dependencia entre la intensidad del haz con la polarización del láser.

Tabla 7 Asignación de picos espectrales del proceso Raman coherente de la **Figura 23** basados en los picos de frecuencias Raman de la **Figura 15**. Se tabulan las longitudes de onda (1, 2, 3, 4 y 5) del proceso coherente y la respectiva frecuencia asignada (entre paréntesis).

	$\lambda_1 (k_1)$	$\lambda_2 (k_2)$	$\lambda_3 (k_3)$	$\lambda_4 (k_4)$	$\lambda_5 (k_5)$	$\lambda_6 (k_6)$
Poliestireno	787.3 nm (1028cm^{-1})	783.2nm (1154cm^{-1})	781.2 nm (1184cm^{-1})	774 nm (1446cm^{-1})	787.3 nm (1028cm^{-1})	N.A.
Metanol	791 nm (921cm^{-1})	787.5 nm (1035cm^{-1})	785 nm (1110cm^{-1})	781 nm	776 nm	771 nm (1454cm^{-1})
DMSO	793 nm (897cm^{-1})	790 nm (955cm^{-1})	787.5 nm (1044cm^{-1})	780 nm (1310cm^{-1})	776 nm (1421cm^{-1})	N.A.
Colágeno	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

Por último, no se colectaron datos respectivos al colágeno debido a la baja intensidad de los picos Raman espontáneo (vibracionales) de acuerdo a la información obtenida en la Figura 15 y Tabla 3.

Capítulo 5. Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo se dividen en tres partes en cuanto el experimento y la metodología para analizar los efectos Raman no lineales, los resultados obtenidos con la configuración de rendija temporal y finalmente en cuanto a los resultados obtenidos con la configuración del enfoque espectral

Se implementó experimentalmente un sistema óptico para inducir efectos Raman coherentes. El sistema óptico puede utilizarse en dos configuraciones experimentales, la primera corresponde a la configuración de rendija temporal para obtener espectros Raman multiplexados y la segunda a la configuración de enfoque espectral.

Se realizó una metodología empírica para el análisis de las señales Raman, la cual consistió en tomar el espectro Raman de las muestras y sustraerle la señal espectral sin muestra. Dando como resultado picos espectrales positivos y negativos correspondientes a los procesos de ganancia Raman y pérdida Raman, respectivamente. Asimismo, fue posible discernir la señal CARS en algunos casos experimentales. El método de análisis se realizó vía software, el cual resultó ser un método intuitivo y rápido de realizar para dictaminar la presencia de señal SRS, CARS, enfoque espectral y estimaciones teóricas.

Se puede mejorar el enfoque espectral de manera fácil y económica consiguiendo cortar los bloques de vidrio.

Debido a la característica espectral de ensanchamiento de ambos pulsos, no se obtuvo el caso ideal para el efecto de rendija temporal. No obstante, y como consecuencia de ello, aun así fue posible observar efectos conjuntos de Raman estimulado (SRS) y Raman anti-Stokes coherente (CARS) en soluciones de dimetilsulfóxido (DMSO). Se apreció el proceso Raman estimulado (SRS) obteniendo ganancia (SRG) en el haz Stokes y pérdida (SRL) en el haz de bombeo.

La señal CARS se obtuvo dependiendo el traslape temporal de pulsos y se pudo ver espectros con una intensidad adecuada para análisis posteriores.

De igual forma debido a la característica espectral de ensanchamiento de ambos pulsos no se obtuvo el caso ideal para el caso ideal para el enfoque espectral. No obstante, en base a los resultados

obtenidos, el ancho temporal de los pulsos láser fue suficiente para que los haces de bombeo y Stokes presentaran a un chirp lineal similar, o cercano, para obtener resolución espectral.

Se observó espectroscopia Raman Coherente con suficiente resolución espectral ($\sim 20 \text{ cm}^{-1}$) obteniendo una adecuada correspondencia comparados con espectros Raman espontáneo (bandas vibracionales), especialmente en el poliestireno y DMSO.

Se determinó que existe dependencia de la polarización de los haces bombeo y Stokes al excitar ciertas frecuencias vibracionales de la muestra.

Literatura citada

Alba Alfonso-García, R. M. (2014). Biological imaging with coherent Raman scattering microscopy: a tutorial. (B. L. University of California, Ed.) *The Journal of Biomedical Optics*, 19(7), 13 doi:10.1117/1.JBO.19.7.071407

Barry R. Masters, P. T. (2008). *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*. Oxford Press.

Begley, R. A. (1974). Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. *Applied Physics Letters*, 25, 387-390

Boyd, R. W. (2008). *Nonlineer Optics*. USA: Elsevier Inc.

Christian W. Freudiger, W. M. (2011). Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation-stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy. *Nature Photonics*, 5. doi:10.1038/NPHOTON.2010.294

Dan Fu, G. H. (2013). Hyperspectral Imaging with Stimulated Raman Scattering by Chirped Femtosecond Lasers. (H. U. Department of Chemistry and Chemical Biology, Ed.) *The Journal of Physical Chemistry B*, 117, 4634-4640. doi:10.1021/jp308938t

García Arthur, M. R. (2003). Diseño y construcción de un autocorrelador de pulsos de femtosegundos usando absorción de dos fotones en un diodo luminiscente. . *Revista Mexicana de Física*, 49(3): 258—263.

Hellere T, A. M. (2004). "Spectral focusing: High spectral resolution spectroscopy with broad-bandwidth laser pulses. *Appl. Phys. Lett.*, 85(1), 25-27.

I. Rocha-Mendoza, W. L. (2008). Coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing with glass dispersion . *Appl. Phys. Lett.*, 93, 201103-1-3.

Iain Robinson, M. A. (Agosto de 2009). Intracellular imaging of host-pathogen interactions using combined CARS and two-photon fluorescence microscopies. *Journal of biophotonics*, 3, 138-146 (8pp.). doi:10.1002/jbio.200910054

~~Israel Rocha-Mendoza, W. L. (2008). Coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing with glass dispersion. *Applied Physics Letters*, 93, 201103(1-3). doi:10.1063/1.3028346~~

Apellido del Autor, inicial del nombre. Año. Título del artículo. Nombre de la revista. Vol.(#) paginas como las que tienes arriba

Israel Rocha-Mendoza, W. L. (2009). Differential coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with linearly chirped femtosecond laser pulses. *Optics Letters*, 34(15), 2258-2260 (3 pp.).

Ji-Xin Cheng, Y. K. (July de 2002). Laser-Scanning Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy and Applications to Cell Biology. *Biophysical Journal*, 502-509 (8pp.). doi:10.1016/S0006-3495(02)75186-2

Maker, P. R. (1965). Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength. *Phys. Rev.*, 137, 801-818 (17 pp.).

- Méndez Pfeiffer, C. A. (2014). Análisis del enfoque espectral con suma de frecuencias ópticas utilizando una sola fuente de femto-segundos. (B. C. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ed.) *Tesis de Maestría en Ciencias*, 80 pp.
- Michiel Muller, A. Z. (2007). Coherent anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *ChemPhysChem*, 2156 - 2170. doi:DOI: 10.1002/cphc.200700202
- Optics.inc, E. (2014). *Edmund Optics*. Obtenido de <http://www.edmundoptics.com/technical-resources-center/optics/optical-glass/>
- Otto, C. C. (1997). Applications of micro-Raman imaging in biomedical research. *Journal of Raman Spectroscopy*, 28, 143-150 (7 pp.).
- Placzek, G. (1934). *Rayleigh-Streuung und Raman-Effekt*. Leipzig: Marx E.
- Potma, E. O., & Mukamel, S. (2012). Coherent Raman Scattering Microscopy. (J.-X. X. Cheng, Ed.)
- Prasad, P. (2003). *Introduction to Biophotonics*. New Jersey, USA: John Wiley and Sons.
- Raman, C. K. (1928). A new type of secondary radiation. *Nature*, 121(501).
- Roth, S., & Freund, I. (1981). Optical 2nd-harmonic scattering in rattail tendon. *Biopolymers*, 20(6), 1271-1290.
- Roth, S., & Freund, I. (1982). Second harmonic-generation and orientational order in connective-tissue a mosaic model for fibril orientational ordering in rat-tail tendon. *Journal of Applied Crystallography*, 15(1), 72-78.
- Schmidt, M., & Kiefer, J. (2013). Polarization-resolved high-resolution Raman spectroscopy with a light-emitting diode. *J. Raman Spectrosc.*, 44, 1625-1627.
- Schott.Inc. (2014). *SCHOTT Corporation*. Obtenido de Enero de 2014: http://www.schott.com/advanced_optics/english/download/schott-abbe-diagram-nd-vd-january-2014-eng.pdf
- Selvrajan, A. (1966). Raman spectrum of dimethyl sulfoxide (DMSO) and the influence of solvents. *A. Proc. Indian Acad. Sci.*, 64(1), 44-50.
- Stellarnet. (2014). *Stellarnet Inc.* Obtenido de el 20 de Agosto de 2014 de: www.stellarnet.us/techspec.htm#techspec
- Thiel, C. W. (2008). Four-wave mixing and its applications. *Faculty of Washington, Washington DC*. Obtenido de: https://www.researchgate.net/profile/Charles_Thiel/publication/241258853_Four-Wave_Mixing_and_its_Applications/links/54756d760cf245eb4370c6fc.pdf
- Thomson, H., Busuttill, A., Eastwood, M., Smith, A., & Elton, R. (1987). Submucosal collagen changes in the normal colon and in diverticular disease. *International Journal of Colorectal Disease*, 2(4), 208-213.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 509-544.

- Wolfgang Langbein, I. R.-M. (2009). Single source coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing. *Applied Physics Letters*, 95, 081109 (3pp.). Obtenido de: doi:10.1063/1.3216073
- Woodbury, E. J. (1962). Ruby laser operation in near IR. *Proceedings of the Institute of Radio Engineers*, (pág. 50 (11 pp.)).
- Zumbusch, A. H. (1999). Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering. *Physical Review Letters*, 82, 20 pp.