



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

**“Correlación temporal de fotones en medios
compuestos y detección de patógenos
mediante dispersión dinámica de luz”**

T E S I S

Que presenta

ANGEL BLADIMIR ZUCCOLOTTO BERNEZ

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

Nanociencias y Nanotecnología

Directores de Tesis:

Dr. Luis Fernando Rojas Ochoa, Departamento de Física.

Dr. Emiliano Fernando Navarro García, Departamento de
Biología Celular.

Ciudad de México

Diciembre, 2017

Contenido

Lista de figuras	v
Abreviaturas	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
Agradecimientos	xv
1 Introducción	1
2 Dispersión de luz	7
2.1 Experimentos de dispersión de luz	7
2.2 Teoría básica de dispersión de luz	9
2.3 Dispersión estática de luz	12
2.3.1 Aproximación Rayleigh-Gans-Debye, RGD	12
2.3.1.1 Factor de forma estático	16
2.3.1.2 Factor de estructura estático	17
2.3.2 Teoría de Mie	20
2.3.2.1 Factor de forma de Mie	22
2.4 Dispersión dinámica de luz	23

3	Técnicas experimentales	31
3.1	Dispersión de luz heterodina en el campo cercano, HNFLS	31
3.1.1	Análisis diferencial	32
3.1.2	Dispositivo HNFLS	34
3.2	Dispersión dinámica de luz tridimensional, 3DDLS	36
3.2.1	Esquema de correlación 3D	37
3.2.2	Dispositivo 3DDLS	38
3.3	Dispersión dinámica de luz tridimensional-Eco, 3DDLS-Echo	39
3.3.1	Modelo teórico de la técnica Echo-DLS	41
3.3.2	Montaje experimental y adquisición de ecos	46
4	3DDLS-Echo. Calibración	59
4.1	Partículas de látex en glicerol puro	60
4.2	Resina epóxica	69
5	3DDLS-Echo. Resultados experimentales	73
5.1	Matrices poliméricas: geles de poliacrilamida	73
5.2	Soluciones coloidales concentradas cargadas	78
5.3	Microreología óptica pasiva	81
6	Caracterización de patógenos	87
6.1	Introducción	87
6.2	Dinámica de la motilidad bacteriana	90
6.3	Cultivos bacterianos y preparación de muestras	93

6.4	HNFLS: protocolo experimental	94
6.5	Métodos analíticos	97
6.5.1	Modelo para la NISF	97
6.5.2	Time Resolved Structuration, TRS	101
6.6	Cinéticas de crecimiento, microscopía y ensayos de motilidad	104
6.6.1	Cinéticas de crecimiento	104
6.6.2	Microscopía	106
6.6.3	Ensayos de motilidad	108
6.7	Resultados de dispersión dinámica de luz	109
6.7.1	Partículas de látex	110
6.7.2	<i>EHEC FN51</i>	111
6.7.3	<i>EPEC E22wt y E22ΔfliC</i>	114
6.7.3.1	Radio hidrodinámico en una mezcla con una fracción α de nadadores y $(1 - \alpha)$ de no nadadores	115
6.7.3.2	Vector de dispersión máximo, q^*	117
6.7.4	<i>Salmonella typhimurium</i>	119
6.7.5	<i>EHEC FN253</i>	122
6.7.6	Tiempo promedio de agitación, τ^*	123
6.7.7	Frecuencia de agitación	126
6.7.8	Resumen de resultados	129
7	Conclusiones	131
	Apéndices	
	Apéndice A	137

Apéndice B 139

Referencias 143

Lista de figuras

Fig. 2.1.1 Esquema básico de un experimento de dispersión de luz	7
Fig. 2.1.2 Patrón de <i>speckles</i>	8
Fig. 2.2.1 Geometría de dispersión	10
Fig. 2.3.1 Esquema de la aproximación RGD	13
Fig. 2.3.2 Factor de estructura de diferentes sistemas coloidales	19
Fig. 2.3.3 Esquema de dispersión de luz por una partícula arbitraria	21
Fig. 2.4.1 Representación en el plano complejo del campo eléctrico $E(\mathbf{q}, t)$ dispersado	24
Fig. 3.1.1 Diagrama esquemático del montaje experimental HNFLS	33
Fig. 3.2.1 Geometría 3D simplificada	34
Fig. 3.2.2 Esquema simplificado del dispositivo de dispersión dinámica de luz tridimensional	37
Fig. 3.3.1 Ecos de 3DDLS para una muestra ergódica con tiempo de relajación largo	38
Fig. 3.3.2 Interpretación alternativa de Echo-DLS	41
Fig. 3.3.3 Montaje de la técnica 3DDLS-Echo	45
Fig. 3.3.4 Ecos de 3DDLS	49
Fig. 3.3.5 Problema al redondear el residuo de T/S_t	50
Fig. 3.3.6 Ecos de 3DDLS de un sistema ergódico a dos periodos de rotación distintos	52
Fig. 3.3.7 Captura de pantalla de la programación del vector de canales de retardo DCh , en LabView	54
Fig. 3.3.8 Efecto del <i>sample time</i>	55

Fig. 4.1.1 Factor de forma de partículas de Látex de 300 <i>nm</i> de diámetro	61
Fig. 4.1.2 <i>Brute force</i> 3D-ICF's para cada una de las muestras	63
Fig. 4.1.3 HR-Echoes	64
Fig. 4.1.4 HR-Echoes normalizados	65
Fig. 4.1.5 3D-ICFs medidas por BF, M_r y M_r rotando a 3.03 Hz	66
Fig. 4.1.6 HR-Echo cero de cada una de las muestras en escala log-lin	66
Fig. 4.1.7 BF, HR-Echoes y LR-Echoes de muestra M2	68
Fig. 4.1.8 Mediciones 3DDLS-Echo escalando las alturas de los LR-Echoes con las obtenidas de los HR-Echoes	68
Fig. 4.2.1 HR-Echoes y LR-Echoes de Resina epóxica	70
Fig. 5.1.1 Factor de forma de la muestra G2	72
Fig. 5.1.2 3DDLS-Echoes de las muestras G1 y G2	74
Fig. 5.1.3 Método Pusey - Van Magen	75
Fig. 5.2.1 Perfil de intensidades de partículas cargadas de dióxido de silicio en una mezcla en peso de DMSO (55%) y agua (45%)	77
Fig. 5.2.2 Factores de estructura dinámicos normalizados en función de q de una muestra de partículas de dióxido de silicio	78
Fig. 5.3.1 Función intermedia de dispersión normalizada gel fijador de cabello	82
Fig. 5.3.2 Módulo elástico y viscoso gel fijador de cabello	83
Fig. 6.2.1 Motilidad bacteriana	88
Fig. 6.2.2 Motilidad bacteriana, detalle	90
Fig. 6.5.1 Ajuste sobre NISF obtenida de una muestra de <i>Salmonella typhi</i>	96
Fig. 6.5.2 TRS de un sistema Browniano de partículas de látex de 400 <i>nm</i>	100
Fig. 6.5.3 TRS de una muestra de <i>Salmonella typhi</i>	101
Fig. 6.6.1 Densidad óptica como función del tiempo	103

Fig. 6.6.2 Imágenes de las bacterias estudiadas tomadas por microscopia	104
Fig. 6.6.3 Imágenes del estudio de motilidad	105
Fig. 6.6.4 Diámetro del halo contra el tiempo de crecimiento	107
Fig. 6.7.1 τ vs. q del análisis de las NISF's de partículas de látex de 400 nm	109
Fig. 6.7.2 S_k vs. τ de todas las bacterias estudiadas	109
Fig. 6.7.3 τ vs. q del análisis de las NISF's de <i>EHEC FN51</i>	111
Fig. 6.7.4 τ vs. q del análisis de las NISF's de <i>E22ΔfliC</i>	111
Fig. 6.7.5 τ vs. q del análisis de las NISF's de <i>E22wt</i>	112
Fig. 6.7.6 Parámetros extraídos del modelo de ajuste para <i>E22wt</i>	113
Fig. 6.7.7 v vs. q de <i>E22wt</i>	116
Fig. 6.7.8 τ vs. q del análisis de las NISF's de <i>Salmonella typhi</i>	118
Fig. 6.7.9 Parámetros extraídos del modelo de ajuste para <i>Salmonella typhi</i>	118
Fig. 6.7.10 v vs. q de <i>Salmonella typhi</i>	119
Fig. 6.7.11 τ vs. q del análisis de las NISF's de <i>EHEC FN253</i>	120
Fig. 6.7.12 Parámetros extraídos del modelo de ajuste para <i>EHEC FN253</i>	120
Fig. 6.7.13 v vs. q de <i>EHEC FN253</i>	121
Fig. 6.7.14 Resultados del análisis de TRS para diferentes q 's	122
Fig. 6.7.15 Velocidad promedio de las bacterias con MB en el rango de vectores de dispersión $q \leq q^*$	125

Abreviaturas

3DDLS	<i>3 Dimensional Dynamic Light Scattering</i>
3DDLS-Echo	<i>3 Dimensional Dynamic Light Scattering-Echo</i>
3D-FCF	<i>3 Dimensional Field Cross-correlation Function</i>
3D-ICF	<i>3 Dimensional Intensity Cross-correlation Function</i>
a	Radio hidrodinámico
AA	Acrilamida
BF	<i>Brute Force</i>
BisA	Bis-acrilamida
d_H	Diámetro Hidrodinámico
DCh	<i>Delay Channels</i>
DDM	<i>Differential Dynamic Microscopy</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
Echo-DLS	<i>Echo-Dynamic Light Scattering</i>
FFDLS	<i>Far Field Dynamic Light Scattering</i>
HNFLS	<i>Heterodyne Near Field Light Scattering</i>
HR-Echoes	<i>High Resolution-Echoes mode</i>
ICF	<i>Intensity Correlation Function</i>
L_τ	Lineal-tau
LALS	<i>Large Angle Light Scattering</i>
LB	Luria-Bertani
LR-Echoes	<i>Low Resolution-Echoes mode</i>
MB	Movimiento Balístico

MD	Movimiento Difusivo
MSD	<i>Mean Squared Displacement</i>
M_τ	Multi-tau
NFDLS	Near Field Dynamic Light Scattering
NISF	Normalized Intermediate Scattering Function
OM	Objetivo de Microscopio
ON	<i>Overnight</i>
PL	Partículas de látex
poliA	Poliacrilamida
q	Vector de dispersión
q^*	Vector de dispersión máximo
RGD	Rayleigh-Gans-Debye
S_k	<i>Skewness</i>
S_t	<i>Sample time</i>
SALS	<i>Small Angle Light Scattering</i>
T	Periodo de rotación
T_d	Periodo de rotación discretizado
τ	Tiempos de retardo
τ^*	Tiempo promedio de agitación
τ_{max}	Tiempo máximo alcanzado
TRS	<i>Time Resolved Structuration</i>
W_s	<i>Window Size</i>

RESUMEN

La dispersión dinámica de luz (DLS) es una técnica experimental no invasiva utilizada para caracterizar el tamaño, estructura y micro-dinámica de sistemas coloidales. Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar con DLS: 1) Materiales suaves complejos ergódicos y no ergódicos que presentan dispersión múltiple moderada. Para lo cual, se implementó la técnica de DLS eco en un dispositivo de detección tridimensional y correlación cruzada de la señal -3DDLS-Echo-. La calibración de la técnica 3DDLS-Echo se realiza con: *i*) partículas de látex suspendidas en glicerol puro con 3 turbideces distintas (sistema ergódico) y, *ii*) resina epóxica endurecida (sistema no ergódico). Mostramos que la estabilidad mecánica y precisión alcanzadas son tal que, las alturas de los ecos representan la dinámica del sistema y que, por lo tanto, la altura del medio eco inicial representa el factor de coherencia del sistema en estudio. Con esta técnica estudiamos sistemas no ergódicos de interés industrial, microreología óptica pasiva de geles fijadores para el pelo, y de ciencia básica, suspensiones coloidales concentradas y matrices poliméricas. 2) Microorganismos con propulsión flagelar (bacterias) en suspensión mediante la técnica heterodina de dispersión de luz en el campo cercano (HNFLS). Con esta técnica se determinaron cinco parámetros mediante dos tipos de análisis de la señal dispersada: *i*) el ajuste de un modelo teórico sobre la función intermedia de dispersión normalizada de las intensidades, método tradicional utilizado de donde estimamos el vector de dispersión máximo accesible para el análisis, la velocidad promedio y el radio hidrodinámico, y *ii*) *Time Resolved Structuration* (TRS), método por primera vez implementado para el estudio de bacterias en suspensión, a partir del cual caracterizamos el estado de agitación de las bacterias, determinando el tiempo promedio de agitación y la frecuencia con que las bacterias entran en dicho estado.

Abstract

Dynamic light scattering (DLS) is a non-invasive experimental technique used to characterize size, structure and micro-dynamics of colloidal systems. The aim of this work is to characterize using DLS: 1) Ergodic and non-ergodic complex soft materials that exhibit moderate multiple scattering. For this purpose, a DLS Echo technique is implemented in a three-dimensional detection scheme using a cross-correlation analysis of the signal -3DDLS-Echo-. The 3DDLS-Echo technique is calibrated with: *i*) latex particles suspended in pure glycerol with three different turbidities (ergodic system) and, *ii*) hardened epoxy resin (non-ergodic system). We show that the mechanical stability and precision achieved in our setup are such that the heights of the echoes represent the dynamics of the system and, therefore, the height of the initial half-echo represents the coherence factor of the system under study. With this technique we characterize non-ergodic systems of industrial interest, passive optical microrheology of hair fixative gel, and basic science: concentrated colloidal suspensions and polymer matrices. 2) Microorganisms with flagellar propulsion (bacteria) in suspension using a heterodyne near field light scattering technique (HNFLS). Five parameters are determined by two different analysis of the scattered signal: *i*) fitting a theoretical model to the normalized intensity intermediate scattering function, from which we estimate the maximum scattering vector accessible in the analysis, the average velocity and the hydrodynamic radius, and *ii*) Time Resolved Structuration (TRS), an analysis method used here for the first time in the study of bacterial suspensions, from which we characterize the state of agitation of the bacteria thus allowing us to determine the average agitation time and the characteristic frequency at which bacteria enters into such state.

Agradecimientos

A todas aquellas personas que han estado en mi vida y que me han guiado a este momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico mediante una beca para estudios de doctorado.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

La dispersión dinámica de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) es una de las técnicas experimentales no invasiva más utilizadas en la caracterización de materiales blandos. A partir de los experimentos de DLS se obtiene información de la dinámica de fluidos complejos en escalas de tiempo en las cuales ocurren las fluctuaciones en el índice de refracción en estos sistemas, y explora estas fluctuaciones en escalas de longitud del orden del inverso del vector de dispersión. Recientes avances en los equipos de detección y las técnicas de procesamiento han abierto nuevos horizontes para la aplicación de las técnicas de dispersión de luz [1]. Por ejemplo, la mejora continua de arreglos bidimensionales de detectores, tales como cámaras basadas en tecnología CCD o CMOS, facilitan la detección espacial de las intensidades dispersadas, aumentando así la estadística acumulada en un solo experimento. El uso más popular que se le ha dado a las técnicas de DLS ha sido la caracterización de sistemas coloidales, con tamaños que van desde decenas de nanómetros hasta algunas micras, por lo que, tradicionalmente han sido utilizadas para determinar el tamaño de partículas en suspensión. Además, esta familia de técnicas han encontrado un amplio rango de aplicación en la investigación del comportamiento dinámico de una gran variedad de materiales blandos como: polímeros, microorganismos, soluciones coloidales concentradas, proteínas en solución, vidrios y cristales coloidales, entre otros [2, 3, 4]. Las técnicas de DLS pueden promediar informa-

ción sobre un gran número de partículas, típicamente miles (depende de la concentración), y proporcionar una medición mucho más precisa, en comparación con técnicas de microscopía, de propiedades estructurales y dinámicas de los materiales. Además, dado que la señal se colecta desde un volumen en la muestra, la información obtenida corresponde a un promedio sobre configuraciones tridimensionales de las partículas en la muestra. Por otro lado, desde el punto de vista dinámico, las técnicas de DLS proveen información cuantitativa en escalas de tiempo que van desde nanosegundos hasta algunas horas, dependiendo de la técnica de dispersión utilizada [2]. De la gran variedad de sistemas que pueden ser estudiados con DLS hay dos grupos que en años recientes han tomado especial importancia: 1) sistemas con procesos de relajación lentos como los que presentan muestras en medios altamente viscosos o con relajación incompleta (sistemas no ergódicos) tales como vidrios coloidales y geles poliméricos [5], por mencionar algunos, y 2) la caracterización de microorganismos como bacterias y algas [4].

Estudiar materiales blandos ergódicos con tiempos de relajación lentos o que presentan no ergodicidad implica estimar propiedades dinámicas en escalas temporales que van desde los segundos hasta centenas de minutos. Mediciones convencionales de sistemas no ergódicos no proveen un adecuado promedio espacial, por lo que se requiere llevar a cabo promedios sobre muchas configuraciones (posiciones distintas de la muestra) para capturar el espacio fase completo de una manera más eficiente, lo que ha llevado a trabajos donde realizan mediciones de horas e incluso días [6, 7]. Esto representa una limitante para trabajar con sistemas con tiempos de medición no accesibles para métodos tradicionales de DLS, tales como los sistemas parcialmente arrestados (ej., vidrios, geles, sistemas coloidales concentrados) o limitados por la estabilidad de la muestra, por ejemplo, sistemas que evolucionan continuamente en el tiempo (biológicos vivos,

envejecimiento de materiales). Una gran variedad de técnicas han sido desarrolladas e implementadas para vencer esta dificultad. Entre ellas, la Dispersión Dinámica de Luz Eco, Echo-DLS, propuesta por Pham *et. al.* [8], reduce considerablemente el tiempo de medición al hacer rotar la muestra de forma rápida y precisa con el fin de explorar diferentes configuraciones del sistema en poco tiempo. Para muestras sólidas, el patrón de *speckles* reaparece después de cada revolución. Si la muestra evoluciona, el patrón de *speckles* cambia debido a la dinámica interna. Esto da como resultado que la función de correlación de las intensidades dispersadas presente ecos (picos) cuyas alturas siguen a la dinámica del sistema.

La técnica Echo-DLS ha sido utilizada con éxito en tres configuraciones experimentales, ver referencias [8, 9, 10]. *Aquí presentamos su implementación en un dispositivo 3DDLS (3 Dimensional Dynamic Light Scattering, LSInstruments, Suiza), y mostramos que el grado de precisión y estabilidad alcanzado es superior que en cualquiera de las anteriores.* Para tal efecto, en este trabajo se estudian sistemas ergódicos con tiempos de relajación lento (partículas de látex en glicerol puro y en gel fijador para cabello) y sistemas no ergódicos (geles de poliacrilamida y resina epóxica dopadas con partículas de látex y suspensiones coloidales concentradas), obteniendo excelentes resultados.

Por otro lado, como segundo tema de estudio, reconocemos la pertinencia de utilizar técnicas de DLS en el estudio de la motilidad de bacterias en suspensión dada su relevancia en medicina y biología. Por citar algunos ejemplos, podemos mencionar que se conoce bien que la virulencia del *Helicobacter pylori* depende de su migración a través de la mucosa epitelial del huésped [11], que la fototaxis de *Chlamydomonas reinhardtii*, y de algunas algas fotosintéticas similares, se basa en la motilidad de estas [12], y que

la reproducción animal descansa en la motilidad espermática. Con DLS se realizan mediciones precisas sobre escalas de tiempo cortas, es una técnica no invasiva, requiere relativamente poca muestra y, tiene una alta sensibilidad. Todas estas características, aunado a la rapidez con la que se obtienen los resultados, hacen de la técnica DLS una herramienta perfecta para el estudio de sistemas biológicos vivos, *active matter*, tales como las bacterias.

Escherichia coli se ha convertido en el modelo de motilidad bacteriana. Para desplazarse utiliza unos apéndices llamados flagelos, los cuales pueden rotar en sentido anti horario provocando que la bacteria se desplace (nade) en línea recta o en sentido horario lo que hace que la bacteria se agite [13]. De los intervalos de nado, con el modelo teórico adecuado sobre la función intermedia de dispersión normalizada (NISF, *Normalized Intermediate Scattering Function*), se puede obtener la distribución de velocidades y la velocidad promedio, que es básicamente el resultado relevante obtenido en trabajos recientes [3, 4]. El número de bacterias censadas en una medición típica es de $\approx 10^4$, el cual es dos órdenes de magnitud mayor comparado con métodos tradicionales de seguimiento (*tracking*) en microscopía ($\approx 10^2$). Sobre los intervalos de agitación y fluctuaciones provenientes de la estructura interna de las bacterias se sabe muy poco en experimentos de DLS.

En esta parte del trabajo de tesis proponemos el uso de la técnica experimental de dispersión de luz heterodina en el campo cercano (HNFLS, *Heterodyne Near Field Light Scattering*), como herramienta para realizar los experimentos de DLS. Para el análisis de los resultados utilizamos el ya tradicional método de ajustar una función sobre la NISF, de donde obtenemos los típicos parámetros de motilidad reportados hasta el

momento. Además, con la finalidad de caracterizar la dinámica de las bacterias en el intervalo de agitación, hacemos uso de un método de análisis poco valorado hasta el momento por la comunidad, la técnica TRS (*Time Resolved Structuration*) [1]. Nuestras observaciones y resultados aquí presentados demuestran que TRS es una herramienta única para complementar la caracterización de la motilidad bacteriana. *El esfuerzo realizado en este trabajo doctoral va encaminado no solo a efectuar una caracterización dinámica de las bacterias, sino a desarrollar un protocolo que permita identificarlas sin ambigüedades mediante experimentos de DLS, lo que significa un paso importante para, en el futuro, implementar un instrumento para identificar bacterias en solución, de forma rápida y a un bajo costo.*

El contenido de la tesis está organizado como se describe a continuación. En el capítulo dos se presenta el marco teórico básico de dispersión de luz. Las técnicas experimentales utilizadas y sus modelos teóricos o esquemas de análisis son descritos en el capítulo 3. Además, en este capítulo se describe el marco teórico de la técnica Echo-DLS y la implementación del dispositivo 3DDLS-Echo. En el capítulo 4 se presentan los resultados de la calibración de nuestra propuesta de 3DDLS-Echo. Esta se lleva a cabo midiendo dos sistemas que representan los extremos de aplicación de la técnica, un sistema ergódico con tiempo de relajación lento (partículas de látex en glicerol puro) y uno no ergódico sólido (resina epóxica). En el capítulo 5 se presentan resultados obtenidos al estudiar tres sistemas no ergódicos de interés tanto industrial como de ciencia básica, medidos con el dispositivo 3DDLS-Echo. Los materiales y métodos, tanto experimentales como de análisis, y los resultados de estudios biológicos de caracterización de las bacterias (ensayos de motilidad, cinéticas de crecimiento y microscopia) así como los de DLS, son descritos en el capítulo 6. Finalmente, en el capítulo 7, a manera de conclusión, hacemos

una discusión de los resultados obtenidos.

Capítulo 2

DISPERSIÓN DE LUZ

2 · 1 EXPERIMENTOS DE DISPERSIÓN DE LUZ

En un experimento convencional de dispersión de luz, un haz monocromático de una fuente de luz láser incide sobre una suspensión coloidal. La interacción entre la luz y las partículas en la suspensión provoca que las partículas radien (dispersen) luz en todas direcciones. Un detector (ejemplos de detectores son: fotomultiplicadores, diodos de avalancha o un sensor CCD o CMOS) colocado en un ángulo θ , *ángulo de dispersión*, con respecto al haz transmitido, se encarga de recolectar la luz dispersada. La intersección entre el haz incidente y el haz dispersado define un volumen llamado *volumen de dispersión* (Fig. 2.1.1).

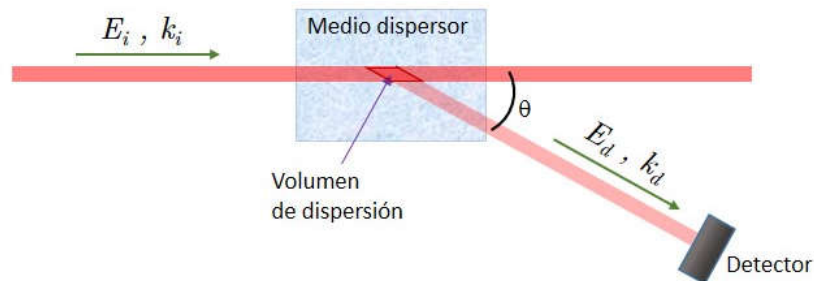


Fig. 2.1.1 Esquema básico de un experimento de dispersión de luz. El volumen formado entre el haz incidente y el haz dispersado es llamado volumen de dispersión.

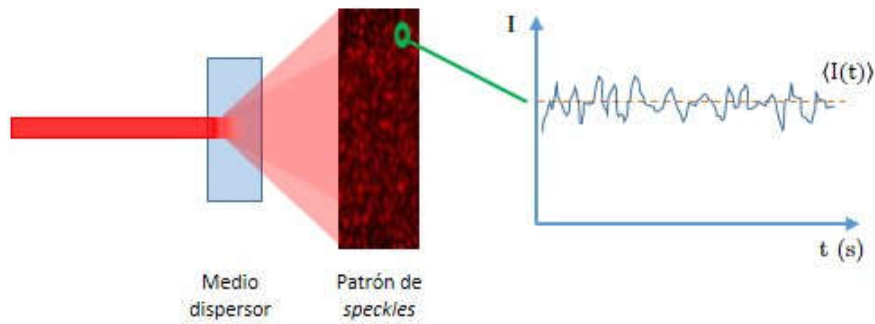


Fig. 2.1.2 El movimiento Browniano de partículas suspendidas en un líquido genera zonas claro-oscuro de intensidad fluctuante en el tiempo conocidas como patrón de *speckles*.

La luz dispersada, que es captada por el detector en un tiempo dado, es la suma o superposición de los campos eléctricos radiados por los dipolos inducidos en el volumen de dispersión y, por lo tanto, depende de las posiciones exactas de estos. La dispersión se observa solo cuando el material estudiado es heterogéneo. En el caso de partículas inmersas en un líquido, la heterogeneidad se debe a que estas se mueven constantemente (movimiento Browniano) [15]. Como resultado, en un experimento de dispersión de luz las relaciones de fase de la luz dispersada por diferentes partículas cambian aleatoriamente, sumándole a esto la fluctuación del número de partículas en el volumen de dispersión, tendremos que las intensidades en el detector cambian en el tiempo, provocando un patrón de manchas claro-oscuro llamadas *speckles*. Si nos fijamos en la evolución de la intensidad de estos *speckles* veremos que esta oscila fuertemente en el tiempo (Fig. 2.1.2) con una determinada correlación temporal bien definida.

Numerosas técnicas experimentales han sido desarrolladas para el estudio de sistemas coloidales [2, 14], estas se pueden clasificar, entre otras maneras, en función de la posición en que se colecte la luz dispersada. Así, por un lado, se puede hablar de dos

regímenes: Dispersión Dinámica de Luz en el Campo Cercano [16], NFDLS (*Near Field Dynamic Light Scattering*), cuando la luz dispersada se colecta muy cerca de la fuente dispersora (distancias del orden de milímetros) y, Dispersión Dinámica de Luz en el Campo Lejano, FFDLS (*Far Field DLS*), cuando se hace a decenas de centímetros de la fuente dispersora. Las técnicas convencionales de dispersión de luz descansan en este último régimen. Por otro lado, también se les puede clasificar con respecto al tamaño del ángulo de dispersión como: Dispersión de Luz a Ángulo Pequeño, SALS (*Small Angle Light Scattering*), cuando $\theta \leq 15^\circ$ y, Dispersión de Luz a Ángulo Grande, LALS (*Large Angle Light Scattering*), cuando $\theta \geq 15^\circ$. Dentro de las técnicas SALS se distingue entre dos tipos de configuraciones: la homodina y la heterodina [16, 17, 18]. En la primera, el haz transmitido es removido evitando que llegue al detector, mientras que en la segunda se saca provecho del mismo. Es así como podemos hablar, por ejemplo, de técnicas como Dispersión de Luz Heterodina en el Campo Cercano, HNFLS (*Heterodyne Near Field Light Scattering*), la cual es una de las técnicas de SALS, o de la técnica de campo lejano y ángulo grande, Dispersión Dinámica de Luz Tridimensional, 3DDLS (*3 Dimensional Dynamic Light Scattering*). Cada técnica tiene sus ventajas y desventajas, discutir las en esta tesis se encuentra fuera del alcance de la misma. Para ampliar la información se recomienda consultar las referencias indicadas.

2 · 2 TEORÍA BÁSICA DE DISPERSIÓN DE LUZ

En esta sección tratamos con el principio básico y conceptos usados para interpretar los experimentos de dispersión de luz sin entrar en los formalismos del proceso de dispersión, para los cuales se recomiendan, adicionalmente a las referencias ya presentadas, las siguientes referencias [19, 20, 21, 22, 23, 24].

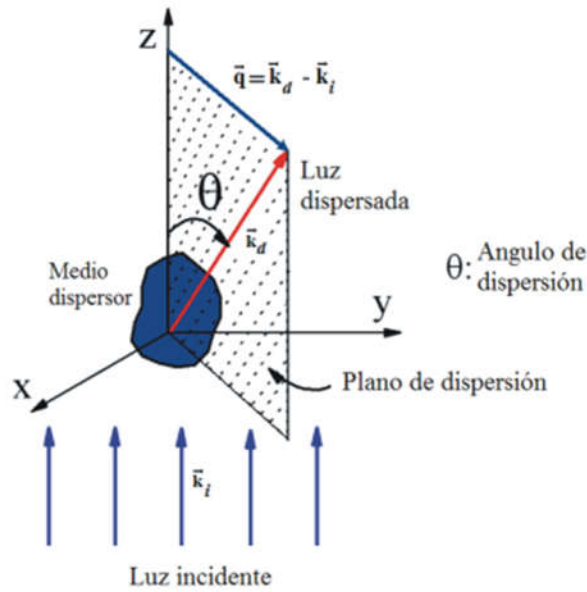


Fig. 2.2.1 Geometría de dispersión. El vector de dispersión corresponde a la diferencia entre el vector de onda incidente y el vector de onda dispersado y el plano en el que se encuentran es el plano de dispersión.

Se considera un medio no magnético, no conductor y no absorbente de constante dieléctrica promedio ε_0 (medio isótropo). Siendo el campo eléctrico incidente una onda plana de luz monocromática de la forma

$$\mathbf{E}_i(\mathbf{r}, t) = \mathbf{n}_i E_0 \exp i(\mathbf{k}_i \cdot \mathbf{r} - \omega_i t). \quad (2.2.1)$$

donde ω_i es la frecuencia, \mathbf{n}_i es el vector de polarización, E_0 es la amplitud, \mathbf{k}_i el vector de onda incidente y $\mathbf{E}_i(\mathbf{r}, t)$ es el campo eléctrico en el punto \mathbf{r} al tiempo t . Aplicando las ecuaciones de Maxwell al problema de una onda plana propagándose a través de un medio con constante dieléctrica local $\varepsilon(\mathbf{r}, t)$; donde $\varepsilon(\mathbf{r}, t)$ es la constante dieléctrica del medio en la posición \mathbf{r} relativa a un origen arbitrario y al tiempo t . La amplitud $E_d(\mathbf{R}, t)$ del campo eléctrico de la radiación dispersada capturada en un punto con posición R sobre el detector en el campo lejano es:

$$E_d(\mathbf{R}, t) = -\frac{E_0 k^2 \exp[i(kR - \omega t)]}{4\pi R} \int_V \left[\frac{\varepsilon(\mathbf{r}, t) - \varepsilon_0}{\varepsilon_0} \right] \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) d^3r, \quad (2.2.2)$$

donde, V es el volumen de dispersión y \mathbf{q} es el vector de dispersión definido como la diferencia entre los vectores de propagación de luz incidente y luz dispersada. El plano en el que se encuentran estos vectores es llamado el plano de dispersión (Fig. 2.2.1)

$$\mathbf{q} \equiv \mathbf{k}_d - \mathbf{k}_i. \quad (2.2.3)$$

Reescribiendo la ecuación (2.2.1) como la suma de los campos $dE_d(\mathbf{R}, t)$ dispersados por los elementos de volumen $\{dV \equiv d^3r\}$ en los puntos $\{\mathbf{r}\}$ obtenemos la siguiente expresión para el campo dispersado:

$$E_d(\mathbf{R}, t) = \int_V dE_d(\mathbf{R}, t), \quad (2.2.4)$$

donde

$$dE_d(\mathbf{R}, t) = -\frac{E_0 k^2 \exp[i(kR - \omega t)]}{4\pi R} \left[\frac{\varepsilon(\mathbf{r}, t) - \varepsilon_0}{\varepsilon_0} \right] dV \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}). \quad (2.2.5)$$

La ecuación (2.2.5) puede identificarse como la fórmula que describe la radiación debida a un dipolo puntual oscilante, por lo que podemos decir que el volumen de dispersión se comporta como un dispersor de Rayleigh. El campo eléctrico con magnitud E_0 y el vector de propagación k inducen en el elemento de volumen dV , en la posición \mathbf{r} , un momento dipolar de amplitud proporcional a $E_0[\varepsilon(\mathbf{r}, t) - \varepsilon_0]dV$, el cual oscila con una frecuencia angular ω y dispersa luz en todas las direcciones. Observe además que, como se mencionó anteriormente, si el medio es totalmente homogéneo, $\varepsilon(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0$, y no hay

dispersión. En otras palabras, la radiación dispersada (para $\mathbf{q} \neq 0$) es causada por fluctuaciones en las propiedades dieléctricas del medio.

En la ecuación (2.2.2) se encuentra la física fundamental detrás de la dispersión de luz, esta nos indica que el campo dispersado consiste en una onda esférica emanando desde el volumen de dispersión con una amplitud dependiente de \mathbf{q} , que representa la transformada de Fourier espacial de las variaciones locales instantáneas de la constante dieléctrica en la muestra. Entonces, cualquier variación en el tiempo de la constante dieléctrica local se refleja directamente en variaciones temporales de la amplitud del campo dispersado y en su intensidad, por lo tanto, la dispersión de luz nos habla de la estructura y dinámica de la muestra en el espacio recíproco o espacio \mathbf{q} .

2 · 3 DISPERSIÓN ESTÁTICA DE LUZ

Cuando la frecuencia de la onda incidente y dispersada son iguales se presenta la dispersión elástica de luz, y los vectores de onda de la luz incidente, \mathbf{k}_i , y dispersada, \mathbf{k}_d , tienen la misma magnitud ($|\mathbf{k}_d| = |\mathbf{k}_i| = k = 2\pi/\lambda$). Entonces, la magnitud del vector de dispersión es:

$$q \equiv |\mathbf{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right). \quad (2.3.1)$$

2.3.1 Aproximación Rayleigh-Gans-Debye, RGD

En este enfoque, la partícula tiene forma arbitraria y es dividida en elementos de volumen que son tratados, cada uno, como dispersores de Rayleigh (dipolos) excitados por

el campo incidente. La aproximación fundamental es que el desplazamiento en la fase de la onda incidente al pasar a través de cualquier punto en la partícula es despreciable, esto es

$$2ka(m - 1) \ll 1 \quad (2.3.2)$$

donde a es la radio de la partícula, $m = n_p/n_s$ es el índice de refracción relativo con n_p el índice de refracción de la partícula y n_s el índice de refracción del medio. Para que esta desigualdad se cumpla tenemos entonces que el sistema en estudio debe presentar un índice de refracción relativo cercano pero mayor a 1, es decir, el índice de refracción de las partículas y el medio deben ser muy parecidos.

Veremos ahora el caso de un medio que contiene partículas dispersoras suspendidas en un líquido (suspensión coloidal). Considerando un volumen de dispersión V con N partí-

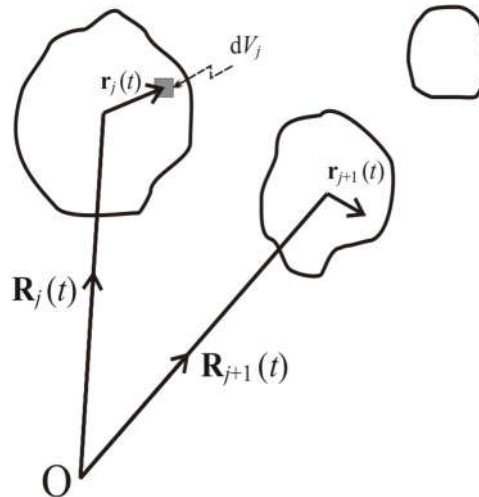


Fig. 2.3.1 Esquema aproximación RGD. Coordenadas de los dispersores discretos relativo a un origen arbitrario O , $\mathbf{R}_j(t)$ es la posición del centro de masa de la partícula j en el tiempo t y $\mathbf{r}_j(t)$ es la posición del elemento de volumen dV_j en la partícula j relativo a su centro de masa.

culas cuyos centros de masa a un tiempo t están localizados por los vectores de posición $\{\mathbf{R}_j(t)\}$. Si $\mathbf{r}_j(t)$ es la posición del elemento de volumen $dV_j = d^3r_j$ en la partícula j relativo a su centro de masa (Fig. 2.3.1), la ecuación (2.2.2) se transforma en

$$E_d(\mathbf{R}, t) = -E_0 \frac{\exp[i(kR - \omega t)]}{R} \times \dots$$

$$\sum_j \left\{ \int_{V_j} \Delta\rho(\mathbf{r}_j, t) \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j) d^3r_j \right\} \exp[-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_j(t)]. \quad (2.3.3)$$

aquí V_j es el volumen de la partícula j y $\Delta\rho(\mathbf{r}_j, t)$ está definida por

$$\Delta\rho(\mathbf{r}_j, t) = \frac{k^2}{4\pi} \left[\frac{\varepsilon_P(\mathbf{r}_j, t) - \varepsilon_L}{\varepsilon_0} \right], \quad (2.3.4)$$

donde $\varepsilon_P(\mathbf{r}_j, t)$ es la constante dieléctrica local en la posición \mathbf{r}_j en la partícula j , ε_L es la constante dieléctrica promedio del líquido, y ε_0 es, como antes, la constante dieléctrica promedio de la suspensión. La cantidad $\Delta\rho(\mathbf{r}_j, t)$ puede ser considerada como la “densidad local del material de dispersión”. Definiendo

$$b_j(\mathbf{q}, t) \equiv \int_{V_j} \left[\frac{\varepsilon_P(\mathbf{r}_j, t) - \varepsilon_L}{\varepsilon_0} \right] \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j) d^3r_j \quad (2.3.5)$$

la ecuación (2.3.3) queda como

$$E_d(\mathbf{R}, t) = -E_0 \frac{\exp[i(kR - \omega t)]}{R} \sum_j b_j(\mathbf{q}, t) \exp[-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_j(t)]. \quad (2.3.6)$$

donde el termino $b_j(\mathbf{q}, t)$ en la sumatoria, definido anteriormente, es la *longitud de dispersión* de la partícula j . De la ecuación (2.3.6) podemos ver que el campo eléctrico total dispersado por el volumen de dispersión es la suma de los campos dispersados por las partículas individuales. Cada uno de estos es el producto de una longitud de dispersión, determinada por la distribución instantánea del material de las partículas, y un factor de fase determinado por la posición instantánea de las partículas en la muestra.

En un experimento de dispersión de luz lo que los detectores miden es la intensidad de la luz dispersada y no el campo eléctrico. Las intensidades y los campos están relacionadas por $I(\mathbf{q}, t) = |E(\mathbf{q}, t)|^2$. Entonces, con la ecuación (2.3.6) obtenemos una expresión para la intensidad de dispersión instantánea:

$$I_d(\mathbf{q}, t) = \frac{E_0^2}{R^2} \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N b_j(\mathbf{q}, t) b_k^*(\mathbf{q}, t) \exp\{-i\mathbf{q} \cdot [\mathbf{R}_j(t) - \mathbf{R}_k(t)]\}. \quad (2.3.7)$$

Para obtener información estructural es necesario realizar un promedio espacial, es decir, sobre el conjunto de partículas dispersoras de esta cantidad, indicado por $\langle \dots \rangle$, el cual es equivalente al promedio temporal si el medio dispersor es ergódico,

$$\langle I_d(\mathbf{q}, t) \rangle = \frac{E_0^2}{R^2} \left\langle \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N b_j(\mathbf{q}, t) b_k^*(\mathbf{q}, t) \exp\{-i\mathbf{q} \cdot [\mathbf{R}_j(t) - \mathbf{R}_k(t)]\} \right\rangle. \quad (2.3.8)$$

En un experimento de dispersión elástica de luz, la intensidad de la luz dispersada es medida como función del vector de dispersión \mathbf{q} . $I_d(\mathbf{q}, t)$ es proporcional a la sección transversal de dispersión, que en principio es el producto del factor de forma $P(q)$ de la partícula, y que esencialmente contiene información acerca del tamaño y forma de las

partículas; y del factor de estructura estático $S(q)$, el cual refleja las interacciones entre las partículas. Se hablará más acerca de estas cantidades en las siguientes secciones.

2.3.1.1 Factor de Forma Estático

La determinación de $P(q)$ para partículas del orden de la longitud de onda es posible analizando muestras muy diluidas del sistema de interés donde las partículas individuales están lo suficientemente separadas espacialmente que sus comportamientos no están correlacionados. Otra forma de escribir la ecuación (2.3.8), omitiendo por simplicidad el prefactor, es

$$\begin{aligned} \langle I_d(\mathbf{q}) \rangle &= \sum_{j=1}^N \langle |b_j(\mathbf{q})|^2 \rangle + \sum_{j \neq 1}^N \sum_{k=1}^N \langle b_j(\mathbf{q}) \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_j) \rangle \langle b_k^*(\mathbf{q}) \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_k) \rangle \\ &= \sum_{j=1}^N \langle |b_j(\mathbf{q})|^2 \rangle \end{aligned} \quad (2.3.9)$$

donde para despreciar el segundo término se ha utilizado el hecho de que, en el tiempo, la partícula j puede tomar cualquier posición en la muestra (ergodicidad), sin afectar la posición de las otras. Entonces, en promedio, los factores exponenciales están aleatoriamente distribuidos alrededor de cero y $\langle b_j(\mathbf{q}) \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_j) \rangle = 0$.

La ecuación (2.3.9) muestra que, en el régimen diluido, la intensidad dispersada promedio es la suma de las intensidades promedio dispersadas por cada partícula. Entonces, una medición de $\langle I_d(\mathbf{q}) \rangle$ como función de \mathbf{q} proporciona información sobre el tamaño, estructura y forma de las partículas promediada sobre la orientación y sobre cualquier

distribución de tamaño y forma. Para partículas idénticas, este promedio de la intensidad dispersada está dado por

$$\langle I_d(q) \rangle = N \langle |b_j(0)|^2 \rangle P(q), \quad (2.3.10)$$

donde

$$P(q) = \frac{\langle |b_j(q)|^2 \rangle}{\langle |b_j(0)|^2 \rangle}. \quad (2.3.11)$$

$P(q)$ es llamado el Factor de Forma de la partícula y está definido de tal manera que $P(q) \rightarrow 1$ cuando $q \rightarrow 0$ y nos da información sobre la estructura de las partículas individuales. Para el caso de una partícula esférica homogénea de radio a el factor de forma es

$$P(q) = \left[\frac{3}{(qa)^3} [\sin(qa) - qa \cos(qa)] \right]^2. \quad (2.3.12)$$

Esta función tiene ceros en $\tan(qa) = qa$, es decir, en 4.49, 7.73... estos ceros son debido a interferencia destructiva de las ondas dispersadas en ángulos particulares.

2.3.1.2 Factor de Estructura Estático.

Mientras $P(q)$ describe los efectos de interferencia por una partícula, el factor de estructura estático $S(q)$ es el resultado de los efectos de interferencia de la luz dispersada por un grupo de partículas. Cada partícula dispersa luz con una dependencia angular dada por $P(q)$, si existe un acomodo regular de estas debido a las interacciones entre ellas, aparecen diferencias de fase entre la luz dispersada por cada una de las partículas

debidas a las diferencias en las longitudes de camino óptico. La superposición de la luz dispersada por todas las partículas conduce al factor de estructura estático $S(q)$, considerado como una medida del orden local del sistema o de las correlaciones espaciales entre partículas.

De la ecuación (2.3.8) y asumiendo por simplicidad que las partículas son esferas homogéneas idénticas de forma que $b_j(\mathbf{q}) = b(q)$

$$\langle I_d(q) \rangle = b^2(q) \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N \langle \exp[-i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{R}_j - \mathbf{R}_k)] \rangle = Nb^2(0)P(q)S(q), \quad (2.3.13)$$

donde $S(q)$ es el Factor de Estructura Estático definido por,

$$S(q) \equiv \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N \langle \exp[-i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{R}_j - \mathbf{R}_k)] \rangle. \quad (2.3.14)$$

Claramente, en un sistema diluido donde las posiciones de las partículas no están correlacionadas, los términos cruzados en la ecuación (2.3.14) desaparecen y $S(q) = 1$.

Las correlaciones espaciales, o estructura, en un sistema concentrado, están usualmente descritas en términos de la “Función de Distribución Radial”, $g(R)$, relacionada con la probabilidad de encontrar el centro de cualquier partícula a una distancia R del centro de otra partícula dada. Específicamente, para N partículas en un volumen V , $(N/V) g(R) dV$ es el número de partículas en el elemento de volumen dV a una distancia R de otra partícula. El factor de estructura está relacionado con la función de distribución radial por

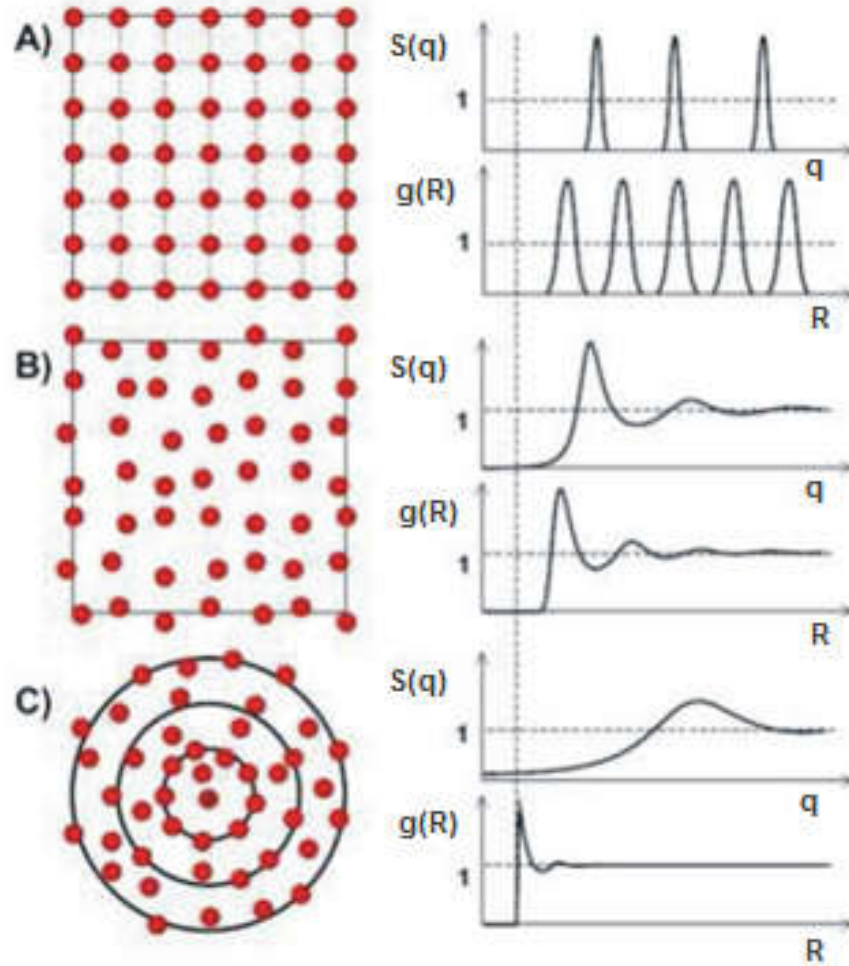


Fig. 2.3.2 Factor de estructura de diferentes sistemas: A) orden de largo alcance (cristal), B) orden local fuerte (ej., líquidos iónicos) y, C) orden local débil (ej., esferas duras).

$$S(q) = 1 + 4\pi \frac{N}{V} \int_0^\infty [g(R) - 1] R^2 \frac{\sin(qR)}{qR} dR. \quad (2.3.15)$$

Algunos ejemplos de $g(R)$ y $S(q)$ se muestran en la Fig. 2.3.2 para distintos casos de estructuras: A) orden de largo alcance (cristal), B) orden local fuerte (ej., líquidos iónicos) y, C) orden local débil (ej., esferas duras).

La estrategia en un experimento de dispersión de luz para medir el factor de estructura es, primero medir la intensidad de luz dispersada por una muestra lo suficientemente diluida garantizando que $S(q) = 1$, con lo que ecuación (1.4.6) queda

$$\langle I_d(q) \rangle_{dil} = N_{dil} b^2(0) P(q), \quad (2.3.16)$$

después, como segundo paso se mide la intensidad dispersada por la muestra concentrada

$$\langle I_d(q) \rangle_{conc} = N_{conc} b^2(0) P(q) S(q). \quad (2.3.17)$$

Finalmente obtenemos el factor de forma haciendo el cociente de estas dos intensidades

$$S(q) = \frac{\langle I_d(q) \rangle_{conc} N_{conc}}{\langle I_d(q) \rangle_{dil} N_{dil}} \quad (2.3.18)$$

2.3.2 Teoría de Mie

El modelo teórico más completo para describir los fenómenos asociados con la dispersión de luz producida por una partícula esférica, isótropa y homogénea, iluminada por ondas planas homogéneas, fue dado por Lorentz (1890) y por Gustav Mie (1908). A partir de mediados de siglo XX, aparecieron los primeros algoritmos capaces de calcular de una manera eficiente los campos dispersados en función de los campos incidentes y las propiedades de las partículas en el campo lejano (Van de Hulst, 1957). Este método de cálculo se basa en la descomposición de las ondas electromagnéticas incidentes, dentro y fuera de la esfera dispersora, en ondas esféricas en términos de funciones armónicas

adaptadas a las condiciones de contorno de la partícula. El campo total dispersado se obtiene en el campo lejano sumando un número suficiente de ondas parciales esféricas, dando como resultado dos soluciones independientes en función de la excitación paralela y/o perpendicular del campo incidente. El campo dispersado en un punto del espacio, definido por el vector de posición \mathbf{r} , en función del campo incidente E_i , y de las características de la partícula, se define respecto a un sistema de coordenadas esféricas con el origen en el centro de la partícula, donde la onda plana incidente se propaga en la dirección z con una polarización lineal con respecto al plano x - y . La teoría de Mie separa la radiación dispersada en dos componentes, una perpendicular y otra paralela al plano de dispersión definido por el vector de propagación de la onda incidente y el vector de propagación de la onda dispersada, denominadas amplitudes de dispersión en el campo lejano (ver Fig. 2.3.3). Bajo las consideraciones anteriormente expuestas estas amplitudes pueden ser escritas de la siguiente manera

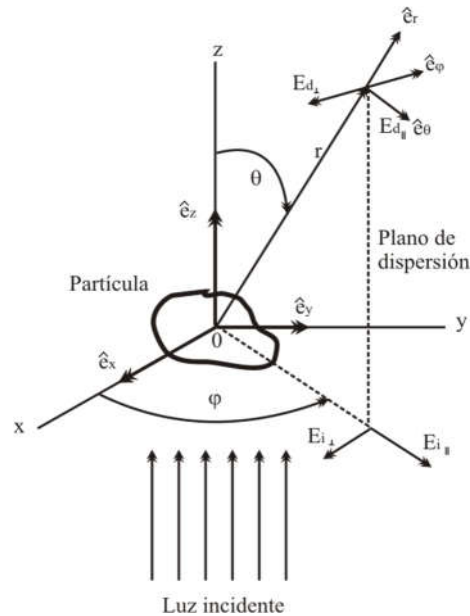


Fig. 2.3.3 Esquema de dispersión de luz por una partícula arbitraria.

$$S_1(\theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \{a_n \pi_n \cos(\theta) + b_n \tau_n \cos(\theta)\} \quad (2.3.19)$$

y

$$S_2(\theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \{b_n \pi_n \cos(\theta) + a_n \tau_n \cos(\theta)\} \quad (2.3.20)$$

donde π_n y τ_n son las funciones angulares de Mie que describen la dependencia angular de la luz radiada en la dirección del ángulo de dispersión θ y están dados en función de los polinomios de Legendre de la siguiente manera

$$\pi_n \cos(\theta) = \frac{1}{\sin(\theta)} P_n^1 \cos(\theta), \quad (2.3.21)$$

y

$$\tau_n \cos(\theta) = \frac{d}{d\theta} P_n^1 \cos(\theta), \quad (2.3.22)$$

mientras que a_n y b_n son conocidas como las amplitudes complejas de las ondas parciales del campo dispersado.

2.3.2.1 Factor de forma de Mie

Las amplitudes pueden ser expresadas por funciones bien conocidas. La función

$$F(\theta, \varphi) = |S_2(\theta)|^2 \cos^2 \varphi + |S_1(\theta)|^2 \sin^2 \varphi \quad (2.3.23)$$

describe la intensidad dispersada. Después de una integración sobre todas las direcciones de polarización de la luz incidente, se obtiene

$$F(\theta) = \frac{1}{2}(|S_2(\theta)|^2 + |S_1(\theta)|^2) \quad (2.3.24)$$

donde $F(\theta)$ es conocido como el factor de forma de Mie.

2 · 4 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ

Las partículas suspendidas en un líquido no son un sistema estático, sino que se encuentran en constante movimiento, conocido como movimiento Browniano, el cual provoca fluctuaciones en la intensidad detectada. La información sobre los procesos difusivos de las partículas puede ser extraída a partir de estas fluctuaciones a partir de la función de correlación temporal, también conocida como función de autocorrelación de la intensidad (en general ICF, *Intensity Correlation Function*)

$$\langle I(\mathbf{q}, 0)I(\mathbf{q}, \tau) \rangle \equiv \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T dt I(\mathbf{q}, t)I(\mathbf{q}, t + \tau). \quad (2.4.1)$$

Esta cantidad compara la señal $I(\mathbf{q}, t)$ con una versión tiempo después $I(\mathbf{q}, t + \tau)$ de sí misma, para todo tiempo inicial t y para un rango τ . Para $\tau = 0$, la ecuación (2.4.1) se reduce a $\langle I^2(\mathbf{q}) \rangle$, mientras que para tiempos τ mucho más grandes que el tiempo de fluctuación típico de la intensidad, τ_c , las fluctuaciones en $I(\mathbf{q}, t)$ y $I(\mathbf{q}, t + \tau)$ no están correlacionadas, de manera que el promedio en la ecuación (2.4.1) puede separarse obteniéndose $\langle I(\mathbf{q}) \rangle^2$. La ecuación (2.3.6) proporciona una expresión general para la amplitud instantánea del campo $E(\mathbf{q}, t)$ dispersado por N partículas en un punto del campo lejano. Para partículas esféricas homogéneas idénticas, todos los $b_j(\mathbf{q}, t)$ tienen el mismo valor $b(\mathbf{q})$ independiente del tiempo. Así, omitiendo los prefactores, se obtiene

$$E_d(\mathbf{q}, t) = \sum_{j=1}^N \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_j(t)). \quad (2.4.2)$$

Cada uno de los factores de fase $\exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_j(t))$ en la ecuación (2.4.2) pueden representarse por un vector unitario en el plano complejo, haciendo un ángulo $\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_j(t)$ con el eje real. El campo total dispersado $E(\mathbf{q}, t)$ es la suma de vectores individuales. Debido a que las partículas están aleatoriamente distribuidas en la muestra, las fases angulares $\{\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_j(t)\}$ están aleatoriamente distribuidas entre 0 y 2π . Por consiguiente, el campo $E(\mathbf{q}, t)$ puede representarse gráficamente como un camino aleatorio bidimensional de N vectores. Como la partícula está en movimiento Browniano, sus posiciones $\{\mathbf{R}_j(t)\}$ cambian, haciéndolo así también los ángulos de fase $\{\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_j(t)\}$. Entonces, el campo total dispersado fluctúa, tal y como se muestra en la Fig. 2.4.1, donde el campo $E(\mathbf{q}, t + \tau)$ al tiempo $t + \tau$ está cambiando desde su valor inicial $E(\mathbf{q}, t)$ al tiempo t . Para pequeñas diferencias en tiempo τ , donde los ángulos de fase no han cambiado mucho, $E(\mathbf{q}, t + \tau)$ y $E(\mathbf{q}, t)$ están todavía correlacionados. Sin embargo, para tiempos en los cuales las fases angulares cambian en aproximadamente 2π (es decir, una partícula se mueve una distancia $\mathbf{R}_j(t + \tau) - \mathbf{R}_j(t) \approx 2\pi/|\mathbf{q}|$), las fluctuaciones en el campo dispersado están totalmente decorrelacionadas. En un experimento de dispersión dinámica de luz, DLS, y para una distribución aleatoria de dispersores las fluctuaciones en la amplitud del campo eléctrico están descritas por la función de autocorrelación temporal normalizada del campo,

$$g^{(1)}(q, \tau) \equiv \frac{\langle E(q, 0)E^*(q, \tau) \rangle}{\langle I(q) \rangle}. \quad (2.4.3)$$

Por otro lado, la cantidad medible experimentalmente es la intensidad dispersada, por

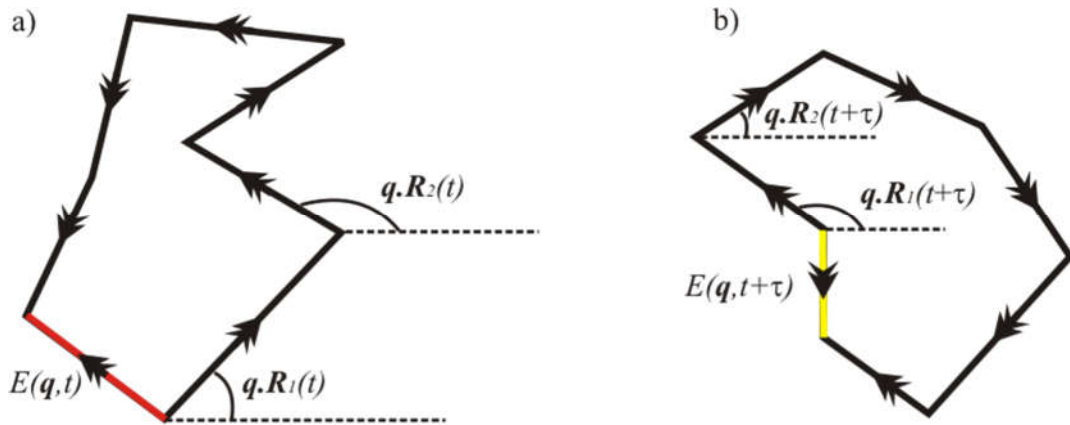


Fig. 2.4.1 Representación en el plano complejo del campo eléctrico $E(\mathbf{q}, t)$ dispersado. a) por seis partículas en las posiciones $\{\mathbf{R}_j(t)\}_{j=1}^6$. El campo es la suma vectorial de los campos dispersados por partículas individuales. b) El campo $E(\mathbf{q}, t + \tau)$ a un tiempo después cuando las partículas se han movido a las posiciones $\{\mathbf{R}_j(t + \tau)\}_{j=1}^6$. En el límite de muchas partículas, $E(\mathbf{q}, t)$ puede considerarse una variable aleatoria Gaussiana.

lo que se hace necesario introducir la función de autocorrelación temporal normalizada de la intensidad

$$g^{(2)}(q, \tau) \equiv \frac{\langle I(q, 0)I(q, \tau) \rangle}{\langle I(q) \rangle^2}. \quad (2.4.4)$$

Las funciones de autocorrelación temporal normalizada del campo y de la intensidad están relacionadas por medio de la relación de Siegert

$$g^{(2)}(q, \tau) = 1 + [g^{(1)}(q, \tau)]^2 \quad (2.4.5)$$

bajo la suposición de una distribución Gaussiana de las intensidades en el intervalo temporal de la medición.

Debido a que en realidad el detector tiene una abertura finita, y del hecho de que no captura luz dispersada proveniente de un volumen de dispersión infinitamente pequeño, la luz detectada no posee un único vector de dispersión. Las interferencias entre los campos correspondientes a distintos vectores de onda introducen un grado de incoherencia espacial sobre el detector, el cual está determinado por el cociente del área del detector y el área de un *speckle*. Este grado de coherencia está representado por el factor β , y haciendo uso de este efecto, la relación de Siegert se escribe como:

$$g^{(2)}(q, \tau) = 1 + \beta [g^{(1)}(q, \tau)]^2. \quad (2.4.6)$$

Cuando el cociente entre el área del detector y el área de un *speckle* es mucho menor que uno (un detector puntual), $\beta \rightarrow 1$, y cuando es muy grande, correspondiente a la detección de muchos *speckles* independientes por el mismo detector, entonces $\beta \rightarrow 0$. En la práctica, la apertura del detector se considera bastante cercana al tamaño de *speckle* cuando $\beta \approx 0.9$.

Usando la ecuación (2.4.2) la función de autocorrelación temporal normalizada del campo puede ser directamente calculada como

$$g^{(1)}(q, \tau) \equiv \frac{\sum_j \sum_k \langle b_j(q, 0) b_k^*(q, \tau) \exp\{-i\mathbf{q} \cdot [\mathbf{R}_j(0) - \mathbf{R}_k(\tau)]\} \rangle}{\sum_j \sum_k \langle b_j(q) b_k^*(q) \exp\{-i\mathbf{q} \cdot [\mathbf{R}_j(0) - \mathbf{R}_k(0)]\} \rangle}. \quad (2.4.7)$$

A $g^{(1)}(q, \tau)$ se le conoce también como función intermedia de dispersión normalizada, (NISF, *Normalized Intermediate Scattering Function*) y se representa también como $f(q, \tau)$. Para partículas idénticas interactuantes, la ecuación (2.4.7) se simplifica a

$$g^{(1)}(q, \tau) = f(q, \tau) \equiv \frac{F(q, \tau)}{S(q)} = \frac{F(q, \tau)}{F(q, 0)}, \quad (2.4.8)$$

donde

$$F(q, \tau) = N^{-1} \sum_j \sum_k \langle \exp\{-i\mathbf{q} \cdot [\mathbf{R}_j(0) - \mathbf{R}_k(\tau)]\} \rangle. \quad (2.4.9)$$

$F(q, \tau)$ es llamada la función intermedia de dispersión y $S(q)$ es el factor de estructura estático. En un experimento de DLS, la NISF es la cantidad de interés y puede obtenerse de las mediciones de la función de autocorrelación temporal normalizada de la intensidad utilizando la ecuación (2.4.6).

Una de las aplicaciones más importantes de la técnica DLS es determinar el tamaño de partículas en suspensión. Esto puede realizarse midiendo las constantes de difusión de las partículas en una suspensión diluida. Por simplicidad considere una suspensión diluida de esferas idénticas, la NISF está dada por

$$f(q, \tau) = \langle \exp\{-i\mathbf{q} \cdot [\mathbf{R}(0) - \mathbf{R}(\tau)]\} \rangle = \langle \exp[i\mathbf{q} \cdot \Delta\mathbf{R}(\tau)] \rangle, \quad (2.4.10)$$

donde

$$\Delta\mathbf{R}(\tau) \equiv \mathbf{R}(0) - \mathbf{R}(\tau), \quad (2.4.11)$$

es el desplazamiento de la partícula en el tiempo τ . En el caso de una suspensión diluida, las mediciones por DLS dan información sobre el movimiento promedio de una sola partícula. El desplazamiento de una partícula en movimiento Browniano es una variable aleatoria tridimensional (real) con una distribución de probabilidad Gaussiana, y cuyo

desplazamiento cuadrático medio, (MSD, *Mean Squared Displacement*), en un tiempo τ está dado por

$$\langle \Delta R^2(\tau) \rangle = 6D_0\tau. \quad (2.4.12)$$

La constante de difusión de partícula libre está dada por la relación de Stokes-Einstein:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (2.4.13)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η la viscosidad del líquido y a el radio hidrodinámico de la partícula. Evaluando la función de dispersión, ecuación (2.4.10), y considerando la distribución gaussiana del movimiento Browniano se obtiene

$$f(q, \tau) = \exp(-q^2 D_0 \tau), \quad (2.4.14)$$

con lo anterior, y si $f(q, \tau)$ es medida en un experimento de DLS, mediante un ajuste exponencial es posible obtener el tiempo de decaimiento dado por $\tau_c = 1/q^2 D_0$, y calcular el radio hidrodinámico de la partícula a partir de la ecuación (2.4.13). En el caso polidisperso, la NISF para una suspensión polidispersa diluida de esferas es la suma de exponenciales, cada una correspondiente a cada partícula, y para distribuciones de tamaño angostas puede expandirse alrededor de la constante de decaimiento promedio $q^2 \langle D \rangle$ por medio del método de cumulantes como

$$f(q, \tau) = \exp(-q^2 \langle D \rangle \tau) \left[1 + \frac{1}{2} \left(\frac{\langle D^2 \rangle - \langle D \rangle^2}{\langle D \rangle^2} \right) \right] (q^2 \langle D \rangle \tau)^2 + \dots \quad (2.4.15)$$

de la cual se obtiene

$$\ln[f(q, \tau)] = -\Gamma_1 \tau + \frac{1}{2} \Gamma_2 \tau^2 - \frac{1}{3!} \Gamma_3 \tau^3 + \dots \quad (2.4.16)$$

donde $\Gamma_1 = \langle q^2 D \rangle$, $\Gamma_2 = \langle (q^2 D - \langle q^2 D \rangle)^2 \rangle$, $\Gamma_3 = \langle (q^2 D - \langle q^2 D \rangle)^3 \rangle$.

Capítulo 3

TÉCNICAS EXPERIMENTALES

La caracterización de los sistemas estudiados en esta tesis se realiza utilizando un par de técnicas de dispersión de luz ampliamente conocidas: Dispersión de Luz Heterodina en Campo Cercano (HNFLS, *Heterodyne Near Field Light Scattering*), la cual es una de técnica tipo SALS (*Small Angle Light Scattering*), y la de Dispersión Dinámica de Luz Tridimensional, 3DDLS (*3 Dimensional Dynamic Light Scattering*), la cual es del tipo LALS (*Large Angle Light Scattering*). Además, dada la naturaleza no ergódica y/o de los tiempos de relajación lentos de algunos de nuestros sistemas, fue necesario la implementación de una nueva técnica experimental que tiene como base la técnica 3DDLS. A esta nueva técnica le hemos dado el nombre de Dispersión Dinámica de Luz Tridimensional-Eco, 3DDLS-Echo.

3 · 1 DISPERSIÓN DE LUZ HETERODINA EN EL CAMPO CERCANO, HNFLS

La configuración heterodina para detección de luz dispersada en campo cercano, complementada con un análisis diferencial de la señal, es una de las técnicas más versátiles utilizadas para obtener información relevante sobre las propiedades dinámicas de materiales blandos [25]. Esta técnica experimental presenta la ventaja de no poseer requerimientos especiales en cuanto a la coherencia espacial de la fuente de iluminación.

Diferentes implementaciones del esquema de detección heterodina han sido utilizadas para estudiar la dinámica de partículas a tiempos cortos usando, por ejemplo, iluminación coherente, HNFLS [26], o luz blanca, Microscopía Dinámica Diferencial (DDM, *Differential Dynamic Microscopy*) [27] y Rayos X [28]. Las técnicas heterodinas se han usado, por ejemplo, en estudios de cinética de agregación coloidal [29, 30], la motilidad de microorganismos vivos [3, 4, 31-33], y para estudiar la orientación de partículas magnéticamente anisótropas bajo el efecto de campos magnéticos externos [34].

En contraste con las técnicas tradicionales SALS, donde la luz es colectada en el régimen de campo lejano, en la técnica HNFLS la luz dispersada se colecta muy cerca de la muestra permitiendo que tanto la luz dispersada como la transmitida lleguen al detector. El montaje experimental es bastante sencillo. Un haz de luz colimado incide sobre una celda rectangular que contiene la muestra. La intensidad dispersada es colectada en un sensor CCD o CMOS de una cámara digital, desde un plano a una distancia z de la muestra, como se muestra en la Fig. 3.1.1. Esta distribución de intensidades tiene la forma típica de un patrón de *speckles*, pero al contrario del caso de los *speckles* en el campo lejano, el tamaño de estos no cambia con la distancia z desde la muestra. En el campo cercano, el tamaño de los *speckles* coincide con el tamaño de los dispersores [16].

3.1.1 Análisis Diferencial

En la técnica heterodina, al detector (un sensor CCD o CMOS) llegan simultáneamente la luz dispersada por la muestra así como el haz transmitido, el cual no se ve afectado por la presencia de los elementos dispersores. En esta configuración, el campo eléctrico estático $e_0(\mathbf{r})$ asociado con el haz transmitido junto con la luz parásita que pueda

existir, actúan como un haz de referencia y en general se le permite interferir con un campo eléctrico mucho más débil y dependiente del tiempo, $e_S(\mathbf{r}, t)$, producto de la dispersión simple, de tal forma que $|e_S| \ll |e_0|$. Esta es la razón del termino heterodino en el nombre de la técnica.

Para el desarrollo de la idea del análisis diferencial, o de doble imagen, supongamos un conjunto de imágenes donde cada una corresponde a una configuración diferente del sistema y que se encuentran separadas entre ellas una distancia temporal Δt . Si i_1 e i_2 representan el patrón de intensidades en dos imágenes tomadas a tiempos t y $\tau = t + k\Delta t$ (donde k es un entero y τ se conoce como el *tiempo de retardo*), respectivamente, se puede escribir para estas [26]

$$i_1(\mathbf{r}, t) = i_0(\mathbf{r}) + e_0(\mathbf{r})e_S^*(\mathbf{r}, t) + e_0^*(\mathbf{r})e_S(\mathbf{r}, t) \quad (3.1.1)$$

$$i_2(\mathbf{r}, \tau) = i_0(\mathbf{r}) + e_0(\mathbf{r})e_S^*(\mathbf{r}, \tau) + e_0^*(\mathbf{r})e_S(\mathbf{r}, \tau) \quad (3.1.2)$$

donde $i_0(\mathbf{r}) = |e_0(\mathbf{r})|^2$. Al restar estas dos ecuaciones obtenemos una expresión independiente de $i_0(\mathbf{r})$,

$$\Delta i(\mathbf{r}, t, \tau) = e_0(\mathbf{r})e_S^*(\mathbf{r}, t) + e_0^*(\mathbf{r})e_S(\mathbf{r}, t) - e_0(\mathbf{r})e_S^*(\mathbf{r}, \tau) - e_0^*(\mathbf{r})e_S(\mathbf{r}, \tau). \quad (3.1.3)$$

Ahora, se calcula el espectro de potencia de la señal, $|\Delta I(\mathbf{q}, t, \tau)|^2$, y se define la función de estructura como [35]

$$\begin{aligned} D(\mathbf{q}, \tau) &\equiv \langle |\Delta I(\mathbf{q}, t, \tau)|^2 \rangle_t \\ &= 4I_S(\mathbf{q}) - 4\Re(\langle E_S(\mathbf{q}, t)E_S^*(\mathbf{q}, \tau) \rangle_t). \end{aligned} \quad (3.1.4)$$

Entonces,

$$D(\mathbf{q}, \tau) = 4I_S(\mathbf{q})[1 - g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)]. \quad (3.1.5)$$

Para muestras isótropas, $D(\mathbf{q}, \tau)$ se puede promediar sobre anillos de diferente radio en el espacio recíproco q . Ahora, para ajustar datos experimentales con la función dada por (3.1.5), se le debe añadir un término $B(q)$ que tome en cuenta las fuentes de ruido que existen al realizar un experimento, tales como: el ruido electrónico en la cámara al adquirir las imágenes y el óptico/mecánico propio del montaje. Bajo estas consideraciones, la función de estructura toma la forma

$$D(q, \tau) = A(q)[1 - g^{(1)}(q, \tau)] + B(q). \quad (3.1.6)$$

Entonces, de acuerdo con la ecuación (3.1.6), es posible acceder a la función de autocorrelación normalizada de los campos $g^{(1)}(q, \tau)$ sin necesidad de usar la relación de Siegert (ver sección 3.2). Esto es de interés para el estudio de sistemas donde los campos dispersados no exhiben estadística Gaussiana y la relación de Siegert no puede ser utilizada [36], permitiendo así estudiar sistemas no ergódicos de forma directa.

3.1.2 Dispositivo HNFLS

El montaje experimental del dispositivo HNFLS usado en nuestro trabajo se ilustra en la Fig. 3.1.1. Físicamente se encuentra en posición vertical y está compuesto por un láser He-Ne de longitud de onda de 632.8 nm , cuyo haz es filtrado espacialmente y colimado a un diámetro de $D \approx 10 \text{ mm}$. El filtro espacial está compuesto por una lente esférica de 8 mm , una plano convexa de 50 mm y un *pinhole* de $20 \text{ }\mu\text{m}$. El haz incide

sobre la muestra, la cual se encuentra contenida en una celda rectangular de cuarzo de 1 mm de camino óptico. Como lente colectora (L) se usa un objetivo de microscopio (OM) $20\times$, 0.5 de apertura numérica y con corrección al infinito de la marca Olympus. La distancia z es de aproximadamente 2 mm , lo que garantiza la condición de campo cercano [37]. Una lente tubular con corrección al infinito (L_T), de Thorlabs, es la encargada de formar la imagen en el plano del sensor CMOS (1280×1024 pixeles, tamaño de pixel de $5.2\times 5.2\mu\text{m}$) de la cámara digital (Lumenera INFINITY-1, color, 12 bits,) con interfaz USB.

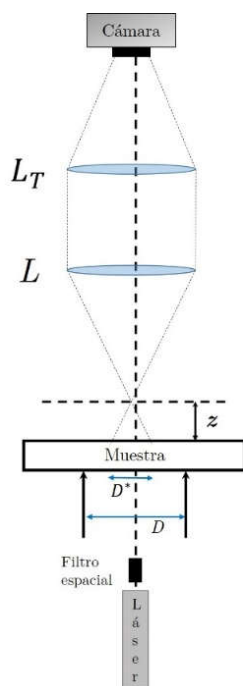


Fig. 3.1.1 Diagrama esquemático del montaje experimental HNFLS. La muestra es iluminada por un haz colimado de diámetro $D = 10\text{ mm}$. La luz transmitida más la dispersada es colectada por las lentes L y L_T desde una distancia z de la muestra creando una imagen magnificada en el plano del sensor de la cámara, la cual se encuentra ligeramente fuera de eje para reducir la luz parásita. D^* es el diámetro de la región en la muestra de donde se colecta la luz dispersada.

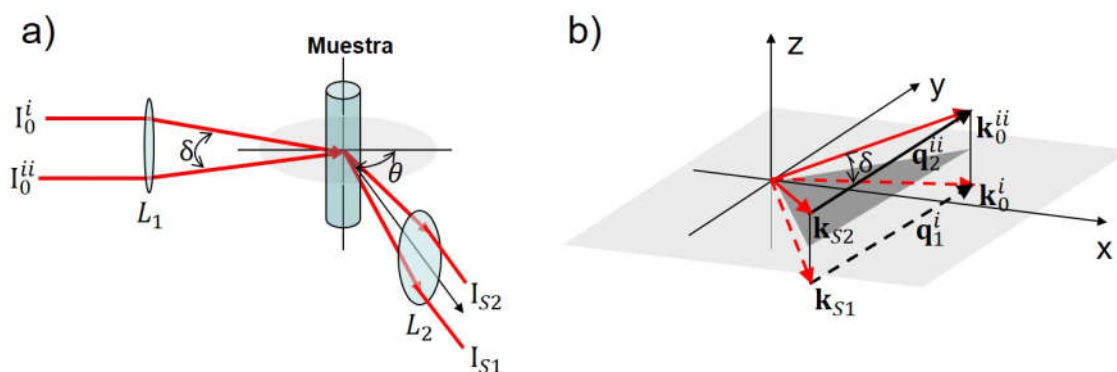


Fig. 3.2.1 a) Esquema simplificado del montaje experimental del equipo de correlación cruzada de luz tridimensional. Dos haces incidentes paralelos I_0^i e I_0^{ii} son enfocados sobre la muestra por la lente L_1 formando un ángulo δ entre ellos. Las intensidades dispersadas I_{S1} e I_{S2} son colectadas por la lente L_2 y guiadas por una fibra monomodo a los detectores APD. Ambas señales son correlacionadas de forma cruzada. b) Diagrama esquemático del arreglo de los vectores de onda \mathbf{k}_0^i y \mathbf{k}_0^{ii} denotando los haces incidentes, mientras que los vectores de onda de los haces dispersados se denotan por \mathbf{k}_{S1} y \mathbf{k}_{S2} . Este arreglo cumple la condición que los vectores de dispersión de ambos experimentos, \mathbf{q}_1^i y \mathbf{q}_2^{ii} , son paralelos y de la misma magnitud.

3 · 2 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ TRIDIMENSIONAL, 3DDL

El dispositivo 3DDL es un arreglo tridimensional robusto de dos fuentes de luz láser y dos detectores, mostrado en la Fig. 3.2.1, para realizar experimentos bajo el esquema de correlación cruzada de fotones [38-41]. Este dispositivo trabaja como uno de dispersión de luz estándar en el cual se pueden realizar experimentos de dispersión de luz dinámica o estática, pero dada su configuración, posee la ventaja de suprimir la dispersión múltiple, lo que permite el estudio de sistemas moderadamente turbios. La eliminación de la dispersión múltiple se logra realizando simultáneamente dos experimentos sobre el mismo volumen de dispersión, Fig. 3.2.1, con vectores de dispersión q

idénticos, pero usando diferentes geometrías. Así, solo la luz dispersada una sola vez producirá fluctuaciones correlacionadas en ambos detectores. En contraste, la luz dispersada múltiples veces resulta en fluctuaciones no correlacionadas debido a que ésta ha sido dispersada en una sucesión de diferentes vectores de dispersión q [25].

3.2.1 Esquema de Correlación 3D

En la geometría 3D uno de los detectores mide la intensidad de luz dispersada a un ángulo de dispersión deseado, pero al mismo tiempo recibe una contribución no deseada del segundo vector de dispersión. La función de correlación cruzada temporal tridimensional normalizada de las intensidades, a la que nos referiremos por simplicidad como 3D-ICF (*3 Dimensional Intensity Cross-correlation Function*) está dada por [25]

$$g_{12}^{(2)}(q, t) = \frac{3\langle I_1(q) \rangle_T \langle I_2(q) \rangle_T + \langle I_1^i(q, 0) I_2^{ii}(q, \tau) \rangle_T}{\langle I_1^i(q) + I_1^{ii}(q) \rangle_T \langle I_2^i(q) + I_2^{ii}(q) \rangle_T} \quad (3.2.1)$$

$$= 1 + \frac{1}{4} \left| g_{12}^{(1)}(q, \tau) \right|^2, \quad (3.2.2)$$

donde los subíndices 1 y 2 denotan los detectores y los superíndices i y ii a los haces de luz láser, los paréntesis $\langle \dots \rangle$ indican un promedio en el ensamble tomado en el tiempo para sistemas ergódicos, y $g_{12}^{(1)} = f(q, t)$ es la función de correlación cruzada temporal tridimensional normalizada de los campos, por simplicidad 3D-FCF, *3 Dimensional Field Cross-correlation Function*. En la geometría 3D el valor ideal máximo alcanzable del *intercept*, $g_{12}^{(2)}(q, 0) - 1$, conocido como factor de coherencia y denotado por β_{12}^0 es 0.25, lo cual se debe a la interferencia entre los dos experimentos simultáneos. Sin embargo, este valor se ve reducido por aspectos que tienen que ver con la alineación

óptica, entonces la función de correlación cruzada tridimensional normalizada de las intensidades se escribe como

$$g_{12}^{(2)}(q, \tau) = 1 + \beta_{12}|f(q, \tau)|^2. \quad (3.2.3)$$

Los efectos de dispersión múltiple se ven reflejados en desviaciones de β_{12} respecto al valor de referencia del equipo, $\beta_{12} < \beta_{12}^{ref}$, donde β_{12}^{ref} es el factor de coherencia medido con un sistema que no presente dispersión múltiple, es decir, que se encuentre en el régimen diluido.

3.2.2 Dispositivo 3DDLs

El dispositivo usado es un espectrómetro 3DDLs de LS Instruments (LS Instruments GmbH, CH-1700 Fribourg, Suiza). Detalles del instrumento fueron descritos anteriormente en [40, 43]. Instrumentos similares han sido realizados por otros grupos [41, 44]. Un esquema del dispositivo se presenta en Fig. 3.2.2. La fuente de luz es un láser de He-Ne de longitud de onda de 632.8 nm, polarizado verticalmente al plano de dispersión. El haz es dividido, con ayuda de un divisor de haz, en dos haces paralelos los cuales son enfocados sobre la celda que contiene el medio dispersor (muestra) por medio de la lente L_1 . Dicha celda se encuentra sumergida en un recipiente de cuarzo que contiene decalin (Decahydronaphthalene, mezcla *cis* y *trans*, al 98%), el cual es un solvente orgánico con un índice de refracción similar al del cuarzo. La temperatura del baño es controlada por medio de un recirculador conectado a un termostato. Una lente L_2 , idéntica a L_1 , es usada para la detección de la luz dispersada la cual es guiada a dos fotodiodos de avalancha (APD, Excellitas Technologies Corp., Waltham, USA). La señal

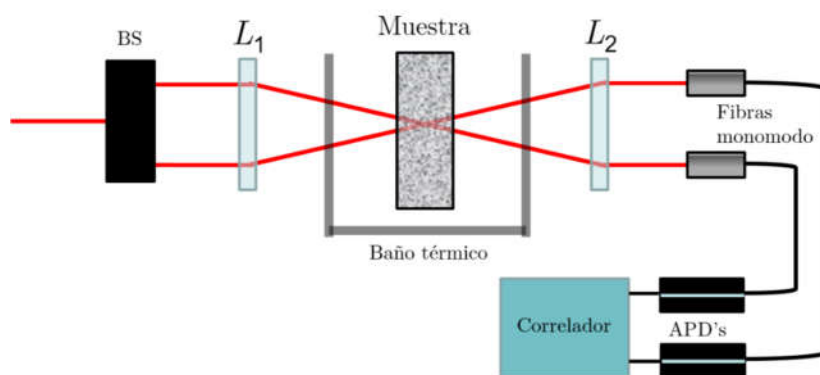


Fig. 3.2.2 Esquema simplificado del dispositivo de dispersión dinámica de luz tridimensional.

de salida de los fotodiodos va a un correlador digital (Flex 031q, Correlator.com) para el cálculo de la función de correlación cruzada de las intensidades en tiempo real. El sistema de detección se encuentra montado en un goniómetro, lo que permite realizar experimentos con diferentes ángulos de dispersión, rango de 15 a 150°.

3 · 3 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ TRIDIMENSIONAL–ECO, 3DDLS-Echo

El interés por estudiar sistemas coloidales con tiempos de relajación largos o que se encuentran arrestados (relajación incompleta debida a la no ergodicidad) tales como geles, vidrios o envejecimiento en sistemas suaves [2], por mencionar algunos, conlleva la necesidad de medir propiedades dinámicas en escalas temporales de segundos e incluso minutos. La técnica DLS es uno de los métodos más usados para estudiar sistemas coloidales fluidos, en los cuales los dispersores se pueden difundir por el medio, con lo que después de un tiempo el sistema evolucionará a través de una fracción representativa de todas sus posibles configuraciones espaciales. Entonces, en un experimento de duración mayor que el tiempo característico de relajación del sistema, éste puede explo-

rar lo suficiente del espacio fase, de tal forma que el promedio temporal proporcione un buen estimado del promedio espacial del sistema [15], es decir, el sistema es ergódico en la ventana experimental. Sin embargo, al intentar medir la dinámica de sistemas ergódicos con tiempos de relajación largos o de sistemas no ergódicos, nos encontramos con el problema de que estas mediciones no proveen un adecuado promedio espacial en tiempos razonables de medición, por lo que promedios sobre muchas configuraciones (posiciones distintas de la muestra) son necesarios para capturar el espacio fase completo de una manera más rápida [45,46], lo que ha llevado a trabajos donde se reportan colección de datos de hasta un día de mediciones [6, 7]. Una gran variedad de técnicas [5, 34, 36, 41, 47-49] han sido desarrolladas para vencer esta dificultad. Una técnica que reduce dramáticamente el tiempo de medición y que nos permite el estudio de estos sistemas es la llamada Dispersión Dinámica de Luz-Eco, Echo-DLS [8-10].

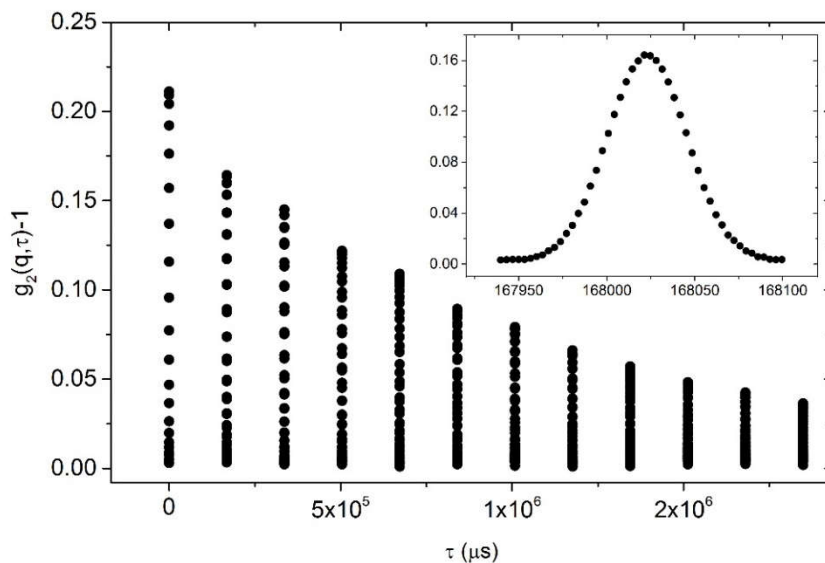


Fig. 3.3.1 Ecos de 3DDLs para una muestra ergódica con tiempo de relajación largo. Dada la escala temporal de medición de los ecos (cada periodo), estos aparecen como picos separados entre ellos por un tiempo T . En el recuadro se muestra uno de estos picos con el eje temporal expandido, lo que nos permite ver la forma de “campana” característica de los ecos.

El principio de la técnica Echo-DLS consiste en rotar la muestra relativamente rápido, lo que provoca que una gran cantidad de *speckles* iluminen el detector. Al realizar mediciones separadas exactamente un tiempo igual al período de rotación y durante una cierta ventana de tiempo, la función de correlación cruzada de la intensidad dispersada presenta picos o ecos, como se muestra en la Fig. 3.3.1, cuyas alturas dan información sobre la evolución dinámica de la muestra. *Lo más importante, y genial, de la técnica es que, ya que los ecos son generados por un gran número de configuraciones independientes, típicamente miles, cada uno de ellos corresponde a un promedio eficiente y representativo del espacio fase obtenido en muy poco tiempo.*

Dada la combinación de la técnica Echo-DLS con el dispositivo 3DDLS, el cual utiliza la técnica de correlación cruzada para suprimir dispersión múltiple (ver sección 3.2.1), tenemos un instrumento que nos permite estudiar una gran variedad de sistemas ergódicos con tiempos de relajación largos y sistemas no ergódicos en un amplio rango de turbideces con tiempos de medición significativamente cortos. *Aquí reportamos la implementación de tal técnica a la que llamamos *Dispersión Dinámica de Luz Tridimensional Echo*, 3DDLS-Echo.*

3.3.1 Modelo Teórico de la Técnica Echo-DLS

En esta sección se presenta un resumen de los principios teóricos de la técnica Echo-DLS, para mayores detalles se sugieren las referencias [8-10] donde se tratan los regímenes de dispersión simple y múltiple.

El fin último de las técnicas de DLS es estimar la ICF para lo cual es necesario, como

se mencionó antes, que el sistema explore una fracción representativa de las configuraciones espaciales accesibles. En la técnica Eco el promedio espacial se lleva a cabo rotando una celda cilíndrica rápidamente durante el tiempo de medición, por lo que una gran cantidad de *speckles* diferentes iluminan el detector localizado en un vector de dispersión q .

Ahora, consideremos una medición con la técnica 3DDLS-Echo. En el momento preciso de inicio, un *speckle* particular, generado por una configuración espacial específica de las partículas, es observado por el detector; después de cada revolución la muestra retorna a la misma posición y el mismo *speckle* ilumina nuevamente el detector. Lo mismo ocurre para diferentes *speckles* generados por otras configuraciones espaciales de los dispersores en la muestra que iluminan el detector dentro de la ventana temporal de medición. Como resultado la 3D-ICF presenta picos o ecos para los tiempos de retardo $\tau = nT$ (Fig. 3.3.1), donde $n = 1, 2, 3, \dots$ es el número de revoluciones y T es el período de rotación de la muestra. En el caso de sistemas ergódicos que presentan caída en los tiempos accesibles a la técnica, la altura de estos ecos decrece para tiempos de retardo nT consecutivos, y el grado de esta reducción está directamente relacionada con la dinámica del sistema. Para el caso límite de muestras rígidas, la altura de los ecos permanece constante para todo tiempo de retardo ya que las partículas se encuentran espacialmente fijas y la muestra regresa exactamente a la misma posición después de cada revolución. Debido a que el número de configuraciones que contribuyen a la obtención de cada uno de los ecos son miles, la altura del eco provee un estimado preciso de la función de correlación de las intensidades para los tiempos de retardo nT .

Para entender de una manera más sencilla el principio de funcionamiento de esta técni-

ca, en lugar de pensar en la muestra rotando, consideremos un experimento equivalente donde un haz incidente y un detector son los que rotan alrededor de un volumen de dispersión fijo de radio R , el cual representa a la muestra. El haz incidente llega a la muestra con dirección \mathbf{k}_i y un detector realiza el conteo de fotones dispersados en dirección \mathbf{k}_s en el campo lejano. Así, ambas direcciones rotan alrededor del eje z de la muestra, pero permanecen fijas una respecto a la otra, de tal manera que el vector de dispersión $\mathbf{q}(t) = \mathbf{k}_s - \mathbf{k}_i$ es constante en magnitud, pero variable en dirección al rotar con velocidad angular constante ω , Fig. 3.3.2. El volumen de dispersión contiene N partículas en las posiciones $\{\mathbf{r}_j(t)\}$.

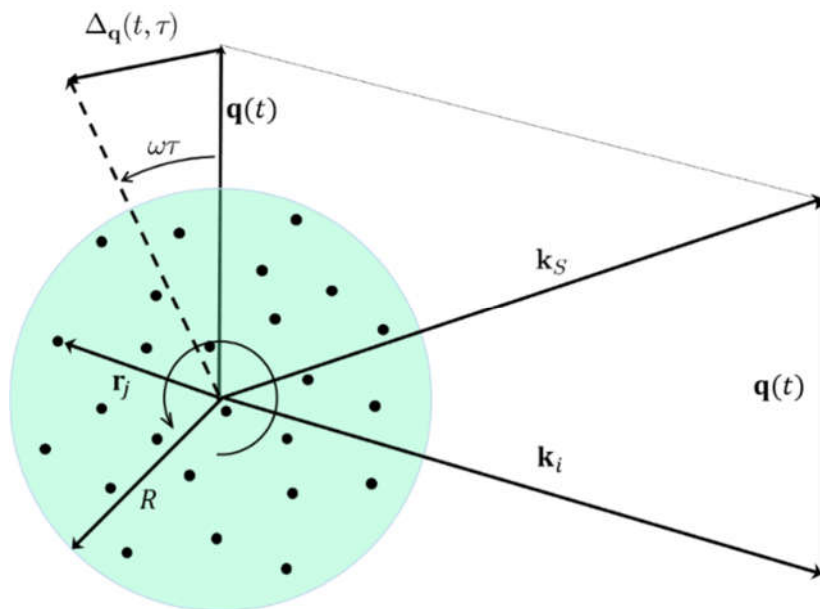


Fig. 3.3.2 Interpretación alternativa Echo-DLS. Volumen de dispersión cilíndrico de radio R con dispersores en las posiciones \mathbf{r}_j . El haz incidente (en dirección \mathbf{k}_i) y el detector (en dirección \mathbf{k}_s) rotan con una velocidad angular constante ω . El vector de dispersión $\mathbf{q}(t)$ rota pero su magnitud se mantiene fija. El vector $\Delta_{\mathbf{q}}$ rota junto con el vector de dispersión y su magnitud depende solo de τ : $\Delta_{\mathbf{q}} = 2q \sin(\omega\tau/2)$.

La función de autocorrelación no normalizada de los campos se puede escribir como

$$G^{(1)}(q, \tau) = \langle E(\mathbf{q}(t), t) E^*(\mathbf{q}(t + \tau), t + \tau) \rangle. \quad (3.3.1)$$

El vector de dispersión, $\mathbf{q}(t + \tau)$, se escribe como la suma del vector de dispersión a un tiempo temprano en la rotación, $\mathbf{q}(t)$, y el vector diferencia, $\Delta_{\mathbf{q}}(t, \tau)$, de la siguiente manera: $\mathbf{q}(t + \tau) = \mathbf{q}(t) + \Delta_{\mathbf{q}}(t, \tau)$, (ver Fig. 3.3.2). Note que, para un valor específico de τ , el vector $\Delta_{\mathbf{q}}$ se encuentra rotando en el tiempo con una velocidad angular ω pero su magnitud se mantiene constante.

Entonces, con la expresión para los campos dispersados, ecuación (2.4.2), la ecuación (3.3.1) puede ser reescrita como

$$G^{(1)}(q, \tau) = \left\langle \sum_j \sum_k e^{i\mathbf{q} \cdot [\mathbf{r}_j(t) - \mathbf{r}_k(t + \tau)]} e^{-i\Delta_{\mathbf{q}}(\tau) \cdot \mathbf{r}_k(t + \tau)} \right\rangle. \quad (3.3.2)$$

Es en esta ecuación donde se observa el importante hecho de que las alturas de los ecos representan a la dinámica del sistema. Vemos que para valores de τ que son múltiplos exactos del período de rotación T , es decir, $\tau = nT$, $n = 1, 2, 3, \dots$, los vectores $\mathbf{q}(t)$ y $\mathbf{q}(t + \tau)$ son exactamente el mismo, y entonces $\Delta_{\mathbf{q}}(t, nT) = 0$, por lo que la segunda exponencial en la ecuación (3.3.2) es simplemente 1. Entonces, la función de correlación para estos valores es exactamente la misma que un promedio espacial de la función de correlación convencional tomada para todo $\mathbf{q}(t)$:

$$G^{(1)}(q, nT) = \left\langle \sum_j \sum_k e^{i\mathbf{q} \cdot [\mathbf{r}_j(t) - \mathbf{r}_k(t + \tau)]} \right\rangle. \quad (3.3.3)$$

Para valores de τ muy cercanos a nT , es decir $\sin(\pi\tau/T) \ll 1$, Δ_q es pequeño y el factor $\exp[-i\Delta_q(\tau)\mathbf{r}_k(t+\tau)]$ es menor que 1. Esto reduce el valor de $G^{(1)}$ respecto al que tendría si no hubiera rotación. En otras palabras, este factor da origen al decaimiento de $G^{(1)}$ debido a la rotación. Para valores de τ lo suficientemente alejados de nT , los campos en $\mathbf{q}(t)$ y $\mathbf{q}(t, \tau)$ son independientes uno del otro; así $G^{(1)}$ es el producto de dos campos promediados de forma independiente y, por lo tanto, igual a cero.

K. N. Pham, *et al.* [8] muestran que la función de correlación normalizada de las intensidades puede ser factorizada en 2 términos: uno que depende de la dinámica del sistema y otro de la rotación de la muestra, siendo la forma analítica de la función de correlación de las intensidades

$$g^{(2)}(q, \tau) = 1 + |f(q, \tau)|^2 |g_r^{(1)}(q, \tau)|^2, \quad (3.3.4)$$

donde $f(q, \tau)$ es la NISF (ver capítulo 2), mientras el factor $g_r^{(1)}(q, \tau)$ es el término asociado con la rotación de la muestra. Si la muestra cilíndrica se encuentra rotando sobre su eje principal a una velocidad muy rápida, este factor tiene la forma

$$g_r^{(1)}(q, \tau) = 2 \frac{J_1(u\sigma)}{u\sigma}, \quad (3.3.5)$$

donde J_l es la función de Bessel de primera especie de orden 1, $u = qR$ es el vector de onda adimensional, R es el radio del volumen de dispersión y $\sigma = 2 \sin(\omega\tau/2)$ define el ángulo rotado por la muestra girando con una frecuencia angular ω . Esta función tiende a 1 cuando $\tau \rightarrow nT$ y la ecuación (3.3.4) se convierte en la función de correlación normalizada de las intensidades convencional para todo q . La expresión (3.3.4) se puede

adaptar para el caso de correlación cruzada haciendo uso de lo visto en la sección 3.2.1 como

$$g_{12}^{(2)}(q, \tau) = 1 + \beta_{12} |f(q, \tau)|^2 |g_{12,r}^{(1)}(q, \tau)|^2, \quad (3.3.6)$$

donde $g_{12,r}^{(1)}$ conserva las mismas propiedades que $g_r^{(1)}$.

3.3.2 Montaje Experimental y Adquisición de Ecos

Como ya se mencionó anteriormente, el montaje experimental tiene como base la técnica 3DDLS, descrita en la sección 3.2, sobre la que se adapta un mecanismo para rotar la muestra de forma estable y precisa, requerimientos básicos para poder obtener ecos de buena calidad. El montaje consiste en un *porta-muestra* de polioximetileno (POM), un motor a pasos de alto torque (Pololu, NEMA HT17) conectado a un controlador (Allegro MicroSystems, Inc., Modelo A4988) el cual es alimentado por un generador de funciones, y, finalmente, un *adaptador* para su anclaje al dispositivo 3DDLS. En la Fig. 3.3.3 se muestra un esquema del montaje junto con una fotografía del mismo sobre el instrumento 3DDLS. El *adaptador* es de acero inoxidable y cuenta con un balero y un buje de teflón para que el *porta-muestra* rote suavemente en su interior. Una transmisión fabricada en aluminio permite acoplar el *porta-muestra* al eje del motor. Pequeñas desalineaciones del eje de rotación desde el motor a la muestra son eliminadas con un *acoplador de ejes*.

Ahora, aunque la precisión en la fabricación de los componentes mecánicos es importante, la electrónica encargada de controlar el motor juega un papel esencial para lograr estabilidad en la rotación del mismo y, por ende, en los ecos.

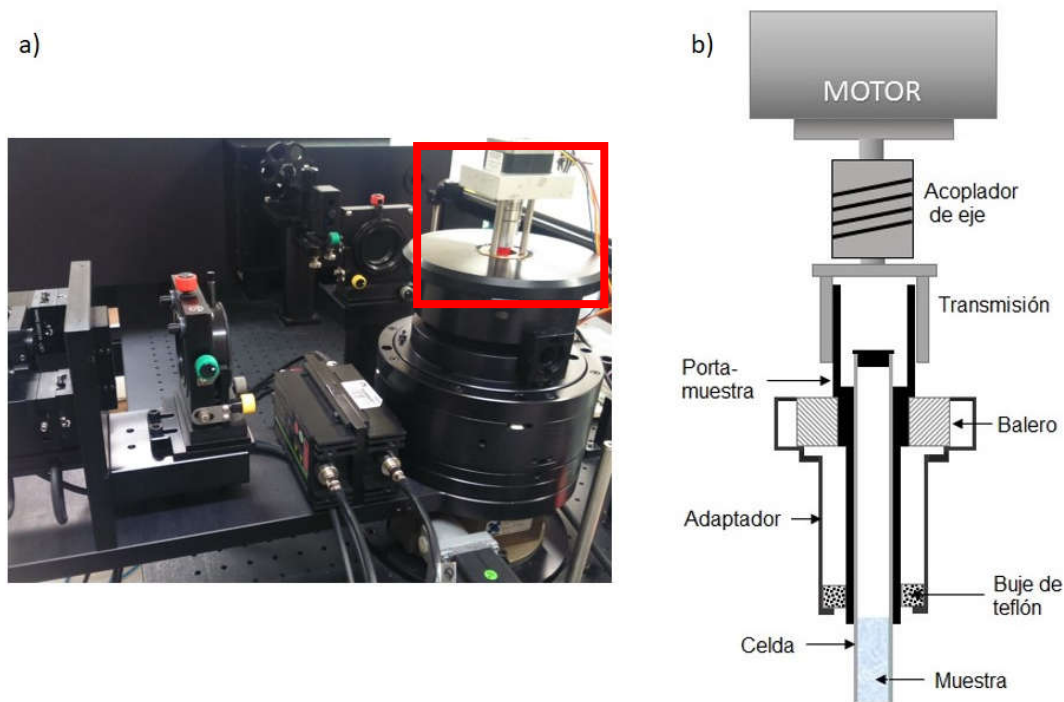


Fig. 3.3.3 Montaje 3DDLs-Echo. a) En el cuadro rojo se muestra la colocación del mecanismo para la rotación de las muestras en el dispositivo 3DDLs. El motor se sujeta con una base que se enrosca en la entrada del 3DDLs. b) Esquema del mecanismo para la rotación de las muestras. La celda entra ajustada en un porta-muestras de POM el cual rota suavemente dentro de un adaptador de acero inoxidable con ayuda de un balero y un buje de teflón. Mediante una transmisión se acopla el porta-muestra al eje del motor. Para eliminar pequeñas desalineaciones entre el eje del motor y de la muestra se usa un acoplador de eje.

Así, problemas como ecos dobles, pérdida de los ecos a tiempos largos o la falta de altura en los mismos se deben, más que a problemas mecánicos, a problemas con la alimentación del motor. Si la corriente y el voltaje no son los adecuados será imposible lograr estabilidad y, por lo tanto, la altura real de los ecos no será alcanzada. El controlador utilizado en nuestro montaje cuenta con un potenciómetro sobre el que se realizan ajustes “finos” para garantizar que la corriente que llega al motor sea la óptima. Cabe mencionar que, aunque es posible obtener ecos con prácticamente cualquier motor a

pasos o “brushless” (en el desarrollo de este trabajo se probaron 5 motores diferentes habiendo obtenido ecos de igual calidad a los obtenidos con el motor utilizado en los resultados presentados en esta tesis), se observó que la calibración de la estabilidad con el potenciómetro es única para cada motor. También se observó que, el que la celda precese “ligeramente” respecto al eje de rotación no representa un problema mayor, ya que, mientras la precisión del motor haya sido optimizada, en cada periodo la muestra regresará al punto inicial sin importar en qué posición, dentro de la precesión, se encuentre la celda.

Pasemos ahora a la adquisición de los datos para la construcción de los ecos. Si, como se dijo antes, la electrónica juega un papel esencial para lograr precisión en la rotación del motor, el realizar una buena adquisición de la luz dispersada es fundamental para alcanzar la estabilidad necesaria para poder medir ecos por decenas de minutos sin perderlos en el camino. El correlador con el que cuenta el dispositivo 3DDLs, un Flex-03lq-12 de Correlator.com, puede calcular la función de correlación normalizada de las intensidades operando en dos modos: como correlador Multi- τ , M_τ , o como correlador Lineal- τ , L_τ . La diferencia funcional entre ambos modos es que mientras el primero tiene *tiempos de retardo* (τ), y *tiempos de muestreo* (S_i , *sample time*) predefinidos para los *canales*, el segundo da la libertad de escogerlos según convenga al usuario, con la restricción de que los τ son múltiplos del S_i . *Por lo tanto, ya que para la técnica eco es medular regresar al punto de inicio de la medición en cada revolución, es el modo L_τ el que se usa para la obtención de los ecos.*

Para la clara comprensión de la técnica eco es de gran importancia familiarizarse con el lenguaje propio del funcionamiento del correlador. Así, cuando se habla de un *canal*

se hace referencia a uno de los 1024 espacios de memoria en los que el correlador guarda la información colectada (conteo de fotones) por los detectores APD durante un tiempo definido por el usuario, llamado S_t . Mientras que τ es el tiempo que el correlador permanece en espera entre canales, es decir, es el tiempo que el correlador pasa sin adquirir datos hasta que “abre” el siguiente canal para adquirir información nuevamente. Por lo tanto, τ NO representa “tiempo real” de medición. Un resumen de las restricciones implícitas en el uso de estos tres parámetros al momento de utilizar el correlador en modo L_τ se presenta a continuación [Correlator.com]:

- A. La unidad temporal básica del correlador en modo L_τ es el S_t , es decir, todos los tiempos con los que tenga que trabajar el correlador estarán “discretizados” en unidades de S_t .
- B. S_t mínimo: 0.4 microsegundos.
- C. S_t máximo: 819.1875 microsegundos.
- D. El número máximo de *canales* disponibles es 1024.
- E. Los *tiempos de retardo*, τ , se definen en función del S_t como: $\tau = DCh * S_t$. Donde DCh son los *canales de retardo* (*Delay Channels*). DCh es un vector de números enteros que pueden ser especificados arbitrariamente dentro del rango 0 a $2^{20} - 1$ y, por lo tanto, el τ máximo accesible es $S_t * (2^{20} - 1)$.

*Resumiendo, para una medición en modo L_τ el correlador recibe como insumos un valor, S_t , y un vector, DCh . Con estas dos entradas el correlador queda configurado para que cada canal permanezca “abierto” durante un tiempo igual a S_t con tiempos de espera entre canales, τ , dados por $S_t * DCh$. Finalmente, para construir la función de correlación normalizada de las intensidades el correlador tomará la información de*

todos aquellos canales igualmente separados, temporalmente, de acuerdo con el τ que se esté analizando.

Ahora se discutirá como utilizar toda esta información de manera inteligente para que la obtención de los ecos sea de la manera más “eficiente” posible. La obtención de los ecos se puede describir como:

La adquisición de los ecos, desde el punto de vista del software, se realiza con el correlador en modo L_τ y los DCh se configuran de tal manera que colecten fotones cada $nT_d \pm W_s/2$, donde W_s (tamaño de ventana, *Window size*) es el número de canales necesarios para capturar, completo, un eco.

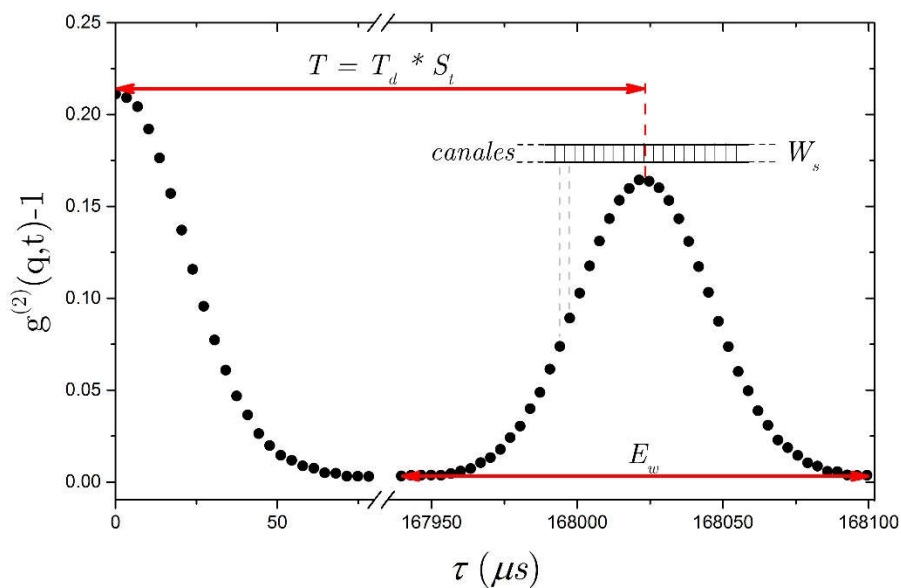


Fig. 3.3.4 Ecos de 3DDLs. Inicial (medio) y primero de la muestra ergódica presentada en Fig. 3.3.1. La distancia temporal entre los máximos de los ecos es igual al periodo de rotación de la muestra, T . E_w es el ancho temporal de los ecos, mientras W_s es el número de canales en el correlador necesarios para capturar cada eco.

Ahora veamos lo que está detrás de las variables T_d y W_s , Fig. 3.3.4. Es importante tener en mente todo lo dicho anteriormente sobre el correlador.

- Sobre T_d , *periodo de rotación discretizado*.

Éste se define como

$$T_d = \frac{T}{S_t} . \quad (3.3.7)$$

Es una variable adimensional que surge de la necesidad de discretizar los tiempos, en este caso el periodo de rotación de la muestra T , en términos del S_t . De esta forma ya sabemos el número de unidades temporales de medición que el correlador tiene que esperar para regresar al punto exacto de inicio de la medición tras cada revolución de la celda, dato importante para la construcción del vector DCh .

Ahora, dado que los elementos de este vector son números enteros, una vez establecido el periodo, *el valor del S_t se debe escoger de tal forma que el residuo de la división T/S_t sea cero*. Esto nos lleva a la obvia conclusión de que no todos los S_t son accesibles en una medición. Ahora, de no hacerse de esta forma y elegir utilizar un S_t cualquiera y posteriormente redondear al entero más cercano, el resultado de T/S_t introducirá ruido numérico a la medición que provocará saltos temporales en los τ de magnitud igual a S_t .

Esto trae como consecuencia inestabilidad provocada por la adquisición de los datos, y no por la rotación de la muestra. En la Fig. 3.3.5 se muestran en cuadros negros los valores de los residuos y en triángulos rojos el redondeo al entero más cercano, ambos en unidades de S_t , para un periodo $T = 329\,642.5 \mu s$ y 3 diferentes

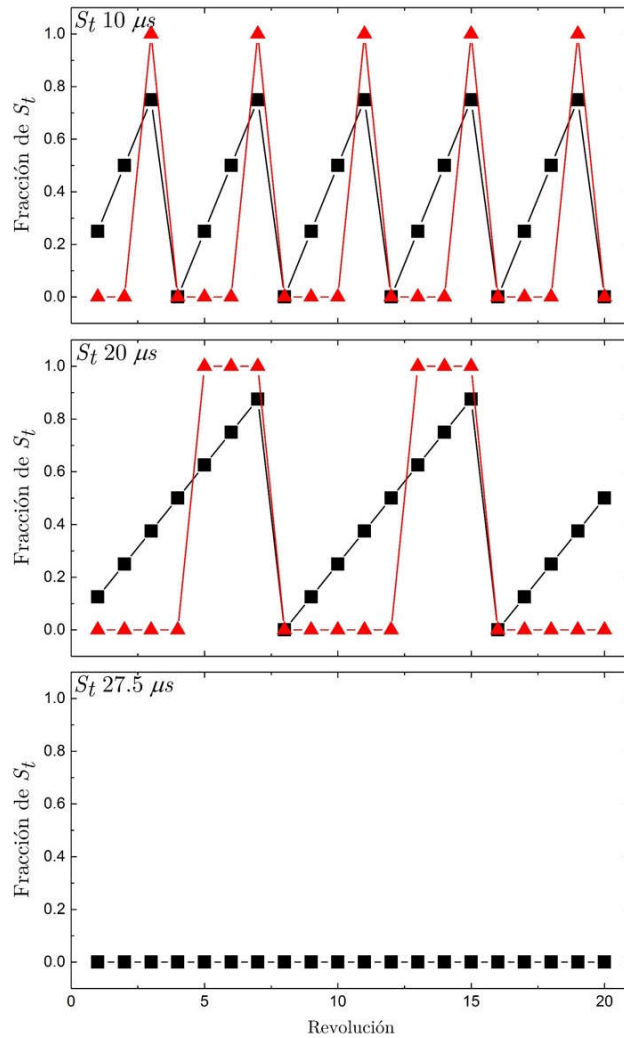


Fig. 3.3.5 Problema al redondear el residuo de T/S_t . En cuadros negros los residuos de la división nT/S_t y en rectángulos rojos el resultado de redondear éstos al entero más cercano, con n el número de revolución, $T = 329\,642.5 \mu s$ y 3 diferentes S_t . Para los S_t de 10 y 20 μs se presenta un salto periódico de magnitud S_t cada cierto número de revoluciones. Para el S_t de 27.5 μs el valor del residuo es cero para toda revolución.

valores de S_t . Los resultados son presentados para las primeras 20 revoluciones. Se observa que para los S_t de 10 y 20 μs los residuos son diferentes de cero y que, al redondear al entero más cercano, después de cada cierto número de revoluciones y de forma periódica, se presenta un salto de magnitud S_t . Ahora, el S_t de 27.5 μs

es un divisor exacto del periodo con el que se está trabajando por lo que el valor del residuo es cero y, por supuesto, no hay necesidad de redondear al entero más cercano, evitando así los problemas de inestabilidad numérica.

- Sobre W_s , *tamaño de ventana*.

Es el número de canales que se asignan en el correlador para “capturar” cada uno de los ecos. Una expresión empírica para estimar un valor *aproximado* de esta variable está dada por:

$$W_s = \left[\frac{2048}{[A] + \lceil A \rceil} \right]_{par}, \quad (3.3.8)$$

donde $A = \tau_{max}/T$. $[...]_{par}$ significa entero par superior, mientras $[...]$ y $\lfloor ... \rfloor$ significan entero superior e inferior respectivamente. El tomar el entero par superior es para evitar números fraccionarios que obligarían a redondear los valores de DCh provocando el mismo tipo de problema que el ilustrado en Fig. 3.3.5. Aunque el valor de W_s calculado con ecuación (3.3.8) es bastante cercano al óptimo para construir el vector DCh (ver discusión en torno a ecuación (3.3.9)), ligeros ajustes pueden ser necesarios. Estos ajustes se hacen sumando o restando un número par a W_s . Una cantidad que se debe considerar al determinar W_s es el número de canales *mínimos* necesarios para definir los ecos adecuadamente. En un experimento que se lleva a cabo a un periodo de rotación T y con un tiempo de muestreo S_t , el tamaño de ventana mínimo es: $W_{s,min} = \lceil E_w/S_t \rceil_{par}$, donde E_w es el *ancho temporal de los ecos* en μs . E_w es el intervalo de tiempo donde los campos eléctricos aún se encuentran correlacionados, es decir, es la ventana temporal dentro del periodo de rotación de la muestra donde los ecos se definen.

Su determinación se hace por inspección directa de los ecos calculados en una medición.

Para esto será necesario, después de haber determinado el periodo con el que se va a trabajar, realizar una medición con un W_s lo suficientemente grande para capturar ecos completos y poder determinar su ancho temporal. Ahora, dado que la forma de los ecos está determinada por la función de rotación $g_{12,r}^{(1)}(q, \tau)$, y de que ésta es función de la velocidad angular, entonces, el ancho temporal de los ecos dependerá de la frecuencia de rotación de la muestra, o lo que es lo mismo, del periodo, tal y como se muestra en la Fig. 3.3.6.

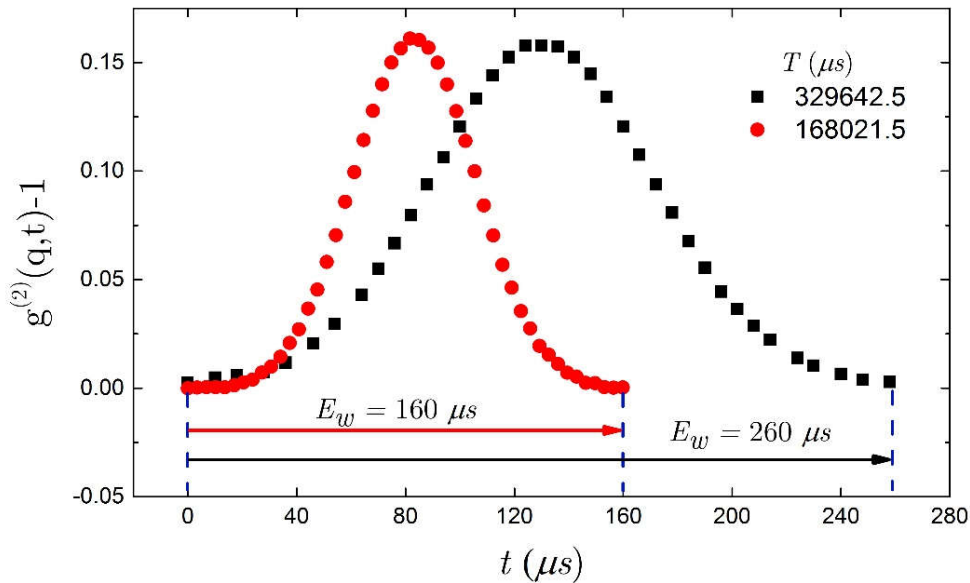


Fig 3.3.6 Ecos de 3DDLs de un sistema ergódico a dos periodos de rotación distintos. En cuadrados para $T_1 = 329642.5 \mu s$ y en círculos para $T_2 = 168021.5 \mu s$. Dado que $T_1 > T_2$, lo que implica $f_{r1} < f_{r2}$, los campos que dan origen a los ecos capturados con T_2 decorrelacionan más rápidamente que los capturados a T_1 y, por lo tanto, $E_w(T_2) < E_w(T_1)$.

A continuación se discute la forma en que se construye el vector de *canales de retardo*, DCh , y se expondrán detalles importantes de su arquitectura. Recordemos que junto al S_t , el vector DCh es uno de los dos únicos insumos que el correlador requiere para funcionar en modo L_τ y su correcta construcción es la parte más importante, en cuanto a programación se refiere, en la captura de información en la técnica 3DDLS-Echo. Es importante recordar un par de parámetros:

1. *Tiempo máximo alcanzado* (τ_{max}). Es el tiempo de retardo máximo accesible al correlador y está dado por: $S_t * (2^{20} - 1)$.
2. *Número de canales en el correlador*. Para el modo L_τ de funcionamiento del correlador se cuentan con 1024 canales.

El vector DCh lo construimos de la siguiente manera

$$DCh = i * T_d - \frac{W_s}{2} + j \quad , \quad (3.3.9)$$

con $i = 0, 1, 2, \dots, N - 1$, donde N es el número total de ecos en la medición y se estima como $N = \lfloor 1024/W_s \rfloor$.

$j = 0, 1, 2, \dots, W_s$.

T_d el periodo de rotación discretizado.

W_s el tamaño de ventana.

Haciendo una inspección rápida de la ecuación (3.3.9) podemos ver que, debido a la elección o cálculo de los parámetros que en aparecen ella, los elementos de DCh son números enteros para todo i y j . Es importante hacer notar que los primeros $W_s/2$

elementos son números negativos que deberán ser omitidos del vector. Esto se debe a que para $i = 0$ (inicio de la medición) no existe parte izquierda del eco inicial, entonces el eco inicial es en realidad medio eco, al que llamaremos *eco cero*, ver Fig. 3.3.4.

Si al construir el vector DCh no alcanzamos τ_{max} , esto implica que hemos “llenado” los 1024 canales del correlador, pero desaprovechando una de sus capacidades al medir hasta tiempos de retardo menores de los que se pueden acceder. Ahora, puede suceder que alcancemos τ_{max} pero que un cierto número de canales queden sin ser utilizados. En estos canales sobrantes se guardará ruido electrónico, lo cual no es conveniente ya que el correlador utiliza todos los canales para construir la función de correlación de las intensidades, incluidos los que por una mala definición de DCh no hayan colectado información del experimento provocando una pobre estimación de los ecos. Ambos problemas son originados por escoger un tamaño de ventana inadecuado ya que, recordemos, el S_t se encuentra fijo de acuerdo con el periodo usado. Cuando no se alcanza τ_{max} se debe a que W_s es muy grande, mientras que si lo alcanzamos y no hemos ocu-

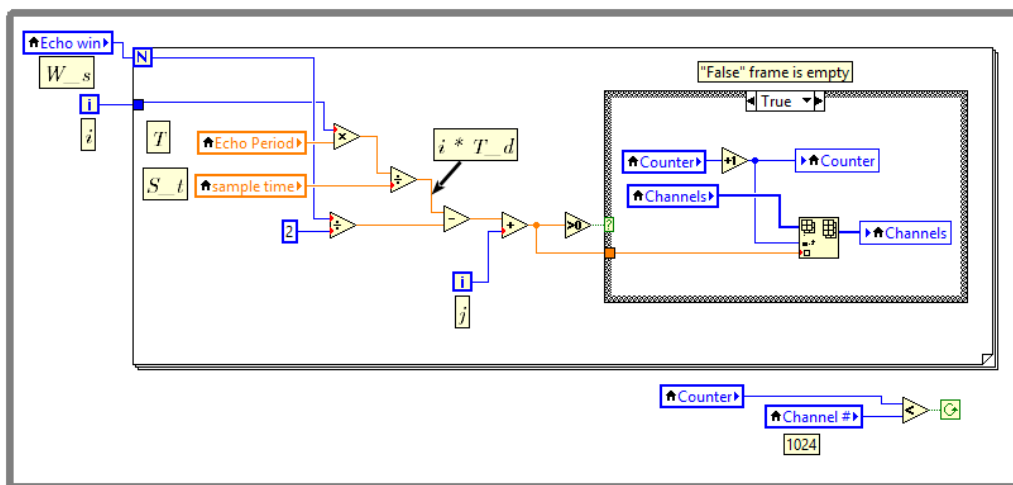


Fig. 3.3.7 Captura de pantalla de la programación del vector de canales de retardo DCh , en LabView™.

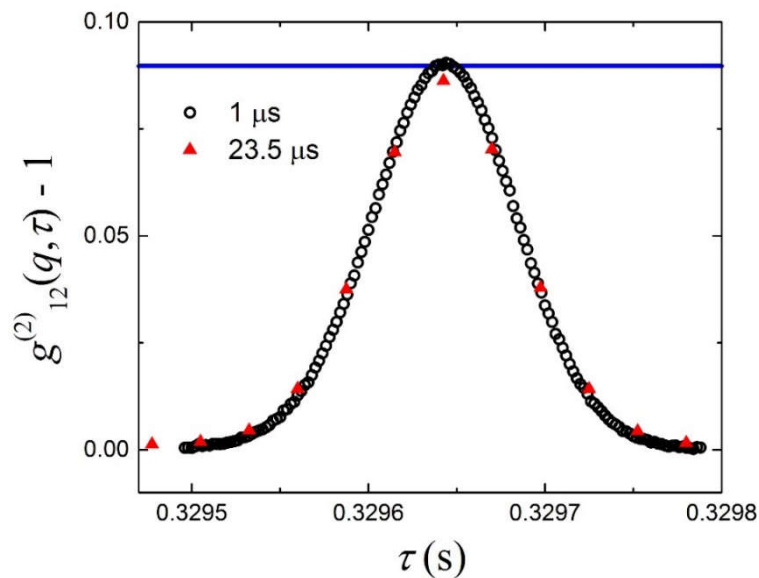


Fig. 3.3.8 Efecto del *sample time*. Se muestra un eco capturado en los modos HR-Echoes ($S_t = 1\mu s$), círculos, y en LR-Echoes ($S_t = 23.5\mu s$), rectángulos, de una medición de 3DDLSEcho. La línea representa el valor de la ICF en el intervalo de tiempo en que se define el eco. En el modo HR-Echo se presenta uno de cada dos puntos para efecto de claridad en la representación.

pado todos los canales implica que W_s es pequeño. En Fig. 3.3.7 mostramos una captura de pantalla de nuestra implementación de la ecuación (3.3.9) en LabViewTM.

Por último, se expondrán detalles adicionales sobre el S_t . El tamaño del S_t fija la resolución con la que contarán los ecos. Por ejemplo, si los ecos tienen un ancho temporal de $280 \mu s$ y se utiliza un S_t de $23.5 \mu s$ estaremos definiendo ecos de baja resolución (*Low Resolution-Echoes mode*, LR-Echoes) al contar estos con solo 12 puntos. Por otro lado, para un S_t de $1 \mu s$ los mismos ecos estarán definidos por 280 puntos, teniendo así ecos de alta resolución (*High Resolution-Echoes mode*, HR-Echoes), como se muestra en la Fig. 3.3.8. Lo realmente importante de este hecho es que, debido a la rotación relativamente rápida de la muestra, la resolución con la que se midan los ecos afectara la altura

que estos alcancen. Así, para los LR-Echoes se promediarán un mayor número de configuraciones del sistema por canal que para los HR-Echoes. Esto provoca que la altura de los LR-Echoes se vea disminuida cerca del 5% con respecto a la altura alcanzada con los HR-Echoes, como se muestra en la Fig. 3.3.8. En otras palabras, en un S_t de $23.5 \mu s$ se promedian 23 puntos, redondeando a números enteros, de los ecos tomados a $S_t = 1 \mu s$. Debemos aclarar que *es la altura de los ecos medidos a $S_t = 1 \mu s$ (HR-Echoes) la que representa fielmente a la dinámica del sistema*, Fig. 3.3.8. Ahora, el problema de medir HR-Echoes es el tiempo de retardo máximo alcanzado, $\tau_{max} = S_t * (2^{20} - 1) \approx 1 s$, el cual es un tiempo corto considerando que la técnica fue pensada para poder acceder a tiempos largos de medición. Por otro lado, para los LR-Echoes ese tiempo es de $\tau_{max} \approx 23.5 s$, el cual es más de un orden de magnitud mayor al τ_{max} alcanzado en los HR-Echoes, permitiendo estudiar muestras con tiempos de relajación más largos o acceder a *plateaus* en sistemas arrestados. En el siguiente capítulo se pone de manifiesto la importancia de esta observación. *Por lo tanto, el protocolo con el que se realizan las mediciones con la técnica 3DDLS-Echo se describe a continuación:*

1. Se miden HR-Echoes usando un S_t de $1 \mu s$. Las alturas de estos ecos nos proporcionan la dinámica a tiempos cortos del sistema.
2. Se miden LR-Echoes usando el S_t adecuado al periodo con el que se trabajará de acuerdo con lo establecido anteriormente.
3. Se utilizan las alturas de los HR-Echoes para escalar las alturas de los LR-Echoes.

De esta forma tenemos mediciones a tiempos de retardo largos que reproducen la dinámica del sistema en los tiempos accesibles a la técnica 3DDLS-Echo.

Capítulo 4

3DDLS-Echo. CALIBRACIÓN

La calibración del dispositivo 3DDLS-Echo se llevó a cabo utilizando dos tipos de sistemas coloidales: 1) sistemas Brownianos, ergódicos, con tiempos de relajación lentos, los cuales se preparan dispersando partículas de látex (PL) en glicerol puro a tres concentraciones distintas y, ii) un sistema rígido, no ergódico, preparado con resina epóxica semitransparente.

Para demostrar la validez de nuestro dispositivo es necesario corroborar dos cosas:

- A. Al igual que un experimento convencional de 3DDLS, la técnica 3DDLS-Echo suprime la dispersión múltiple en sistemas moderadamente turbios.
- B. Las alturas de los ecos siguen fielmente a la dinámica del sistema en estudio.

Con este fin, se diseñan dos sistemas que representan los extremos en experimentos de DLS, en cuanto a dinámica y ergodicidad se refiere. Por un lado, tenemos un sistema ergódico Browniano lento, como lo son las suspensiones coloidales de PL en glicerol puro (con tres turbideces distintas), y por otro, un sistema no ergódico rígido hecho con una resina epóxica heterogénea semitransparente. Los experimentos fueron realizados a un ángulo de dispersión de $\theta = 90^\circ$.

<i>Muestra</i>	ϕ	<i>Transmitancia</i>	β
M1	2.0×10^{-5}	0.88	0.21
M2	7.5×10^{-5}	0.29	0.16
M3	2.0×10^{-4}	0.08	0.12

T. 4.1.1 Muestras hechas con PL de 165 nm de radio dispersas en glicerol puro. La concentración de PL aumenta de M1 a M3 mientras la transmitancia y el factor de coherencia disminuyen.

4 · 1 PARTÍCULAS DE LÁTEX EN GLICEROL PURO

Los sistemas ergódicos se elaboraron con PL de 165 *nm* de radio (Invitrogen, Molecular Probes, Usa) dispersas en glicerol puro. La viscosidad elevada del glicerol (1.4138 Ns/m^2 a 20°C) provoca que la 3D-ICF decaiga en el rango de tiempos accesibles a la técnica eco. Las muestras se prepararon y sellaron dentro de celdas de vidrio (Fisherbrand) de 10 y 8 mm de diámetro exterior e interior, respectivamente, a tres concentraciones distintas de PL con el fin de controlar la turbidez de las muestras: Muestra 1 (M1), con una concentración de PL de $\phi_1 \approx 2.0 \times 10^{-5}$, la cual es lo suficientemente pequeña para evitar dispersión múltiple pero garantiza que la intensidad dispersada por las partículas es por lo menos 100 veces más grande que la del glicerol solo, mostrando una transmitancia de $T_{M1} = 0.88$ y un factor de coherencia $\beta_1 \approx 0.21$. Muestra 2 (M2), tiene una concentración de PL de $\phi_2 \approx 7.5 \times 10^{-5}$ lo que nos da dispersión múltiple moderada, $T_{M2} = 0.29$, y $\beta_2 \approx 0.16$. Muestra 3 (M3), con una concentración de PL de $\phi_3 \approx 2.0 \times 10^{-4}$, donde tenemos dispersión múltiple alta, $T_{M3} = 0.08$, y $\beta_3 \approx 0.12$. En la tabla T. 4.1.1 se presenta un resumen de las muestras.

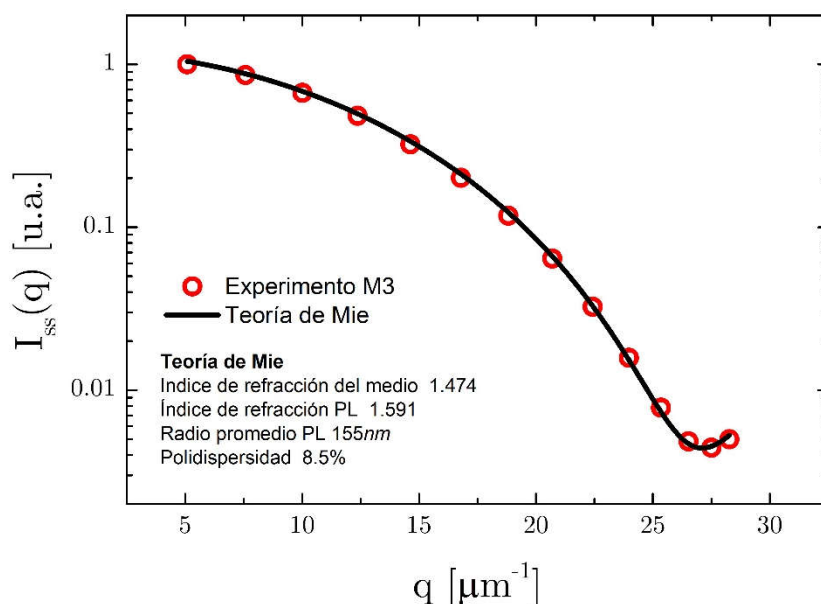


Fig. 4.1.1 Factor de forma PL 310 nm diámetro. En círculos se muestra el perfil de intensidades normalizado obtenido de la muestra M3. La línea representa el cálculo con teoría de Mie para esferas dieléctricas en glicerol.

Para elaborar las muestras, el glicerol se calentó a 40°C y se añadieron las partículas para después ser agitadas en un vortex por 60 s. Cada muestra, ya con las partículas, se calentó y agitó un par de veces más. Para corroborar que las partículas se dispersaron adecuadamente, medimos su perfil de intensidades $I_{ss}(q)$, donde *SS* significa *Single Scattering*. En la Fig. 4.1.1 se muestran el resultado experimental $I_{ss}(q)/I_{ss}(0)$ de la muestra M3 y el calculado mediante la teoría de Mie para esferas dieléctricas en glicerol [15] (en la leyenda del gráfico se muestran los parámetros utilizados). El radio estimado del análisis es 155 nm, el cual es un valor aceptable de acuerdo con el reportado por el fabricante (165 nm, obtenido por métodos de DLS) ya que en mediciones de perfiles de intensidad (dispersión estática de luz) los radios estimados son entre 5 y 10% menores que los obtenidos en experimentos de dispersión dinámica. Más adelante se verá que las mediciones de DLS nos dan un radio mucho más cercano al nominal. Además, el buen acuerdo entre el experimento y lo calculado con teoría de Mie nos demuestra que,

incluso la concentración más alta estudiada es lo suficientemente pequeña de tal forma que la dependencia angular de la intensidad de dispersión es proporcional al factor de forma estático de las partículas.

Las mediciones con la técnica 3DDLS-Echo de las tres muestras de PL se realizaron a una temperatura de 20 ± 0.3 °C y siguiendo el protocolo descrito al final del capítulo 3. El periodo de rotación utilizado fue de $T = 329\ 632.5$ μs , lo que nos da una frecuencia $f_r = 3.03$ Hz y una anchura de eco de $E_w = 260$ μs . El tiempo de muestreo, que es un divisor entero para este periodo y que es usado para la captura de los LR-Echoes es $S_t = 27.5$ μs , el tamaño de ventana es de $W_s = 14$ canales, ecuación (3.3.8), y se promedian 10 mediciones independientes de 300 s cada una. Tal y como se menciona en el protocolo, los HR-Echoes son capturados con un tiempo de muestreo de $S_t = 1$ μs , el tamaño de ventana es de 294 canales, ecuación (3.3.2). Se realizan mediciones de 40 s, promediando sobre 10 mediciones independientes. La magnitud del vector de dispersión, Ec. (2.3.1), es $q = q_1 = 20.7$ μm^{-1} ($\theta = 90^\circ$, índice de refracción del glicerol, $\eta_G = 1.474$).

Nuestros resultados corresponden al promedio de 10 mediciones independientes, lo cual nos permite explorar regiones distintas en la muestra. En sistemas ergódicos las partículas se dispersan uniformemente y cada región en la que se realice una medición es representativa de todo el sistema por lo que hacer 10 mediciones no sería del todo necesario, pero, observamos que al promediar un cierto número de mediciones (el número depende del tipo de sistema) se minimizan errores en la obtención de la 3D-ICF provocados por posibles irregularidades en la dispersión de las partículas en el

medio. Ahora, para sistemas no ergódicos en los que las partículas se encuentran atrapadas, diferentes regiones en la muestra representan diferentes subconfiguraciones del sistema, por lo que resulta necesario promediar varias de estas regiones para construir de forma adecuada la 3D-ICF.

Para corroborar los resultados obtenidos con la técnica 3DDLS-Echo, se midió la 3D-ICF de cada uno de los sistemas realizando experimentos convencionales de 3DDLS (donde, recordando, el correlador funciona en modo M) por el método de fuerza bruta (BF, *Brute Force*). Este método consiste en medir con la muestra estática un tiempo tal que la 3D-ICF obtenida es representativa del sistema. Empíricamente, este tiempo resulta ser 10,000 veces el tiempo al que queremos acceder en sistemas que no presentan dispersión múltiple, incrementándose en función de la turbidez del sistema, ya que la

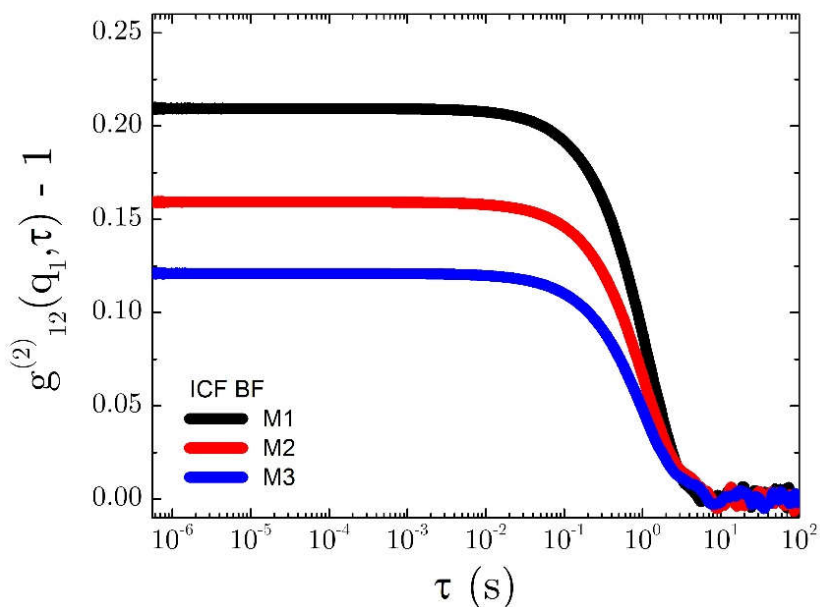


Fig. 4.1.2 *Brute force* 3D-ICF's para cada una de las muestras, obtenidas del promedio de 16 mediciones independientes para M1, 28 para M2 y 38 para M3, donde cada medición tuvo una duración de 3600 s.

señal útil proveniente de dispersión simple se ve disminuida. Bajo estas consideraciones, las 3D-ICF's de BF mostradas en Fig. 4.1.2 fueron obtenidas promediando sobre 16 mediciones independientes para M1, 28 para M2 y 38 para M3, donde cada medición tuvo una duración de 3600 s. Además, con estas mediciones y haciendo uso de las ecuaciones (2.4.13) y (2.4.14) se determinó el radio hidrodinámico de las partículas para cada una de las muestras, los resultados son: 158.3 nm para M1, 162.7 nm para M2 y 168.5 nm para M3, teniendo un radio hidrodinámico promedio de 163.20 ± 5 nm, que como se esperaba es muy cercano al proporcionado por el fabricante. Estos resultados nos demuestran que las 3D-ICF's de BF medidas son representativas de nuestros sistemas.

Antes de ver los resultados obtenidos con el protocolo de medición dado en el capítulo anterior, se analizarán las mediciones hechas para los HR-Echoes con el fin de mostrar resultados importantes encontrados durante este trabajo. En la Fig. 4.1.3 mostramos los HR-Echoes para: M1 en círculos, M2 en cuadrados y M3 en triángulos. Las líneas representan el valor que las 3D-ICF's obtenidas mediante BF tienen para los tiempos en los que se definen los ecos en cada una de las muestras. Aquí vemos que *la altura de los ecos sigue la dinámica del sistema al estar en muy buen acuerdo con las 3D-ICF's obtenidas mediante BF*, por lo tanto, al igual que en un experimento convencional de 3DDLS, las alturas de los ecos se ven reducidas con el aumento en el grado de turbidez del sistema y están de acuerdo con la dinámica del mismo. Ahora, se espera que, para sistemas con dinámica equivalente, pero con diferente cantidad de dispersión múltiple, las 3D-ICF's medidas en un instrumento 3DDLS colapsen en una misma curva después de haber normalizado cada una de ellas por su factor de coherencia correspondiente,

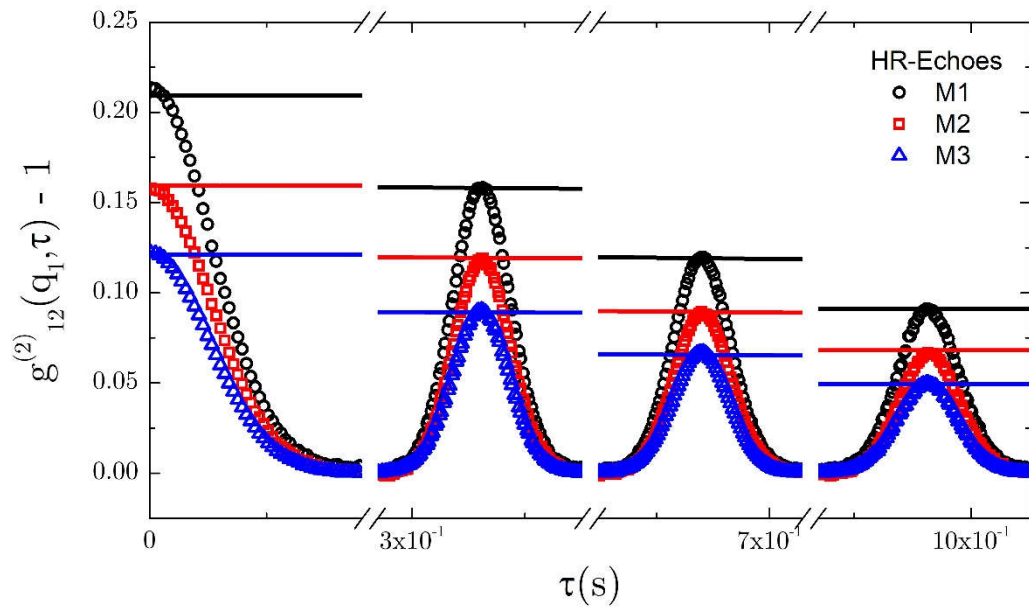


Fig. 4.1.3 HR-Echoes de M1 en círculos, de M2 en cuadrados y de M3 en triángulos. Las líneas son el valor de las 3D-ICF's de BF para los tiempos en los que se definen cada uno de los HR-Echoes.

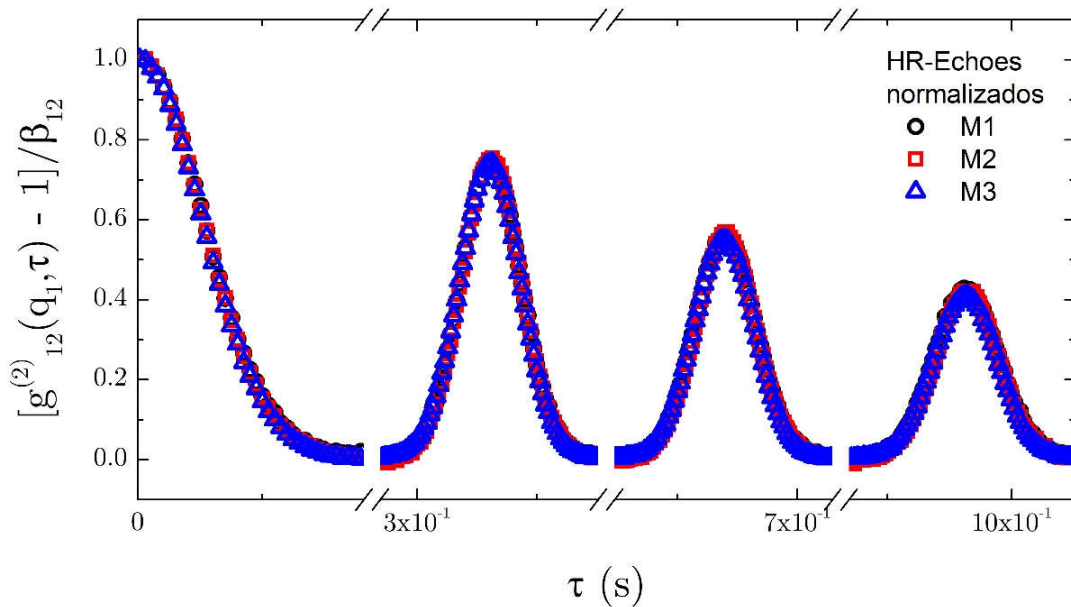


Fig. 4.1.4 HR-Echoes de M1 en círculos, M2 en cuadrados y M3 en triángulos, normalizados con la altura del eco cero (factor de coherencia) correspondiente de cada una de las muestras.

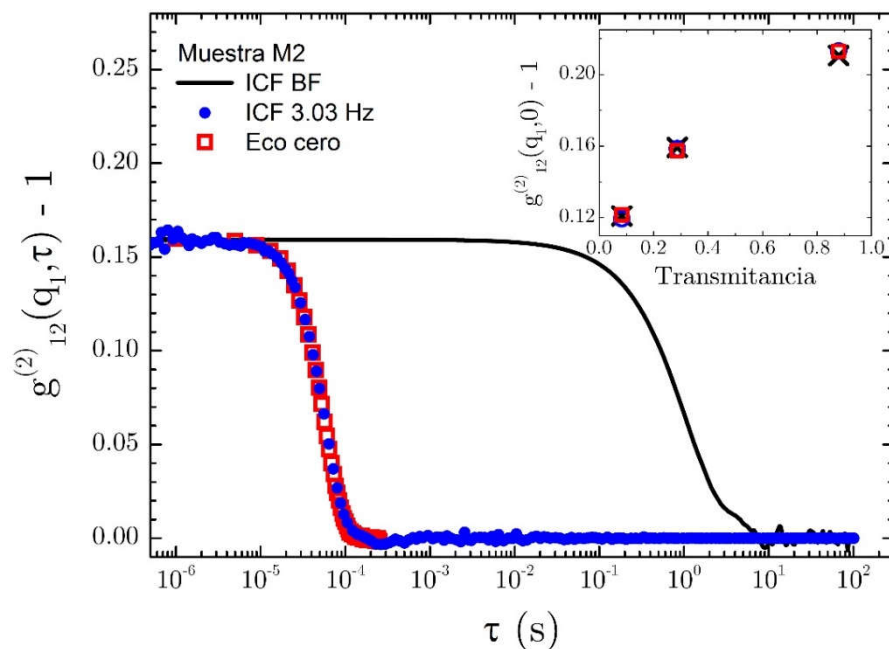


Fig. 4.1.5 3D-ICF's medidas por BF (línea), rotando a 3.03 Hz en modo M_τ (círculos) y eco cero para la muestra M2 (cuadrados). En el recuadro: factor de coherencia para las tres muestras en función de la transmitancia obtenidos por BF (cruces), rotando (M_τ) a 3.03 Hz (círculos) y 3DDLS-Echo (cuadrados).

entonces lo mismo debe suceder con los ecos, hecho que es ilustrado en la figura Fig. 4.1.4 donde hemos utilizado como factor de coherencia la altura del eco cero (medio eco inicial) de cada una de ellas. Por lo tanto, *la altura del eco cero es una medida directa del factor de coherencia del sistema*, $\beta_{12} = g_{12}^{(2)}(q, 0) - 1$, como se muestra en la Fig. 4.1.5.

Hasta el momento los gráficos de las mediciones hechas con la técnica 3DDLS-Echo se han mostrado en escala lineal-lineal por claridad para la discusión, pero al presentarlas en escala logarítmica-lineal vemos que el eco cero presenta la forma de una 3D-ICF medida tradicionalmente en el instrumento 3DDLS en modo M_τ , tal y como se ilustra en la Fig. 4.1.6, con un tiempo característico de caída τ_r afectado por la rotación de la muestra.

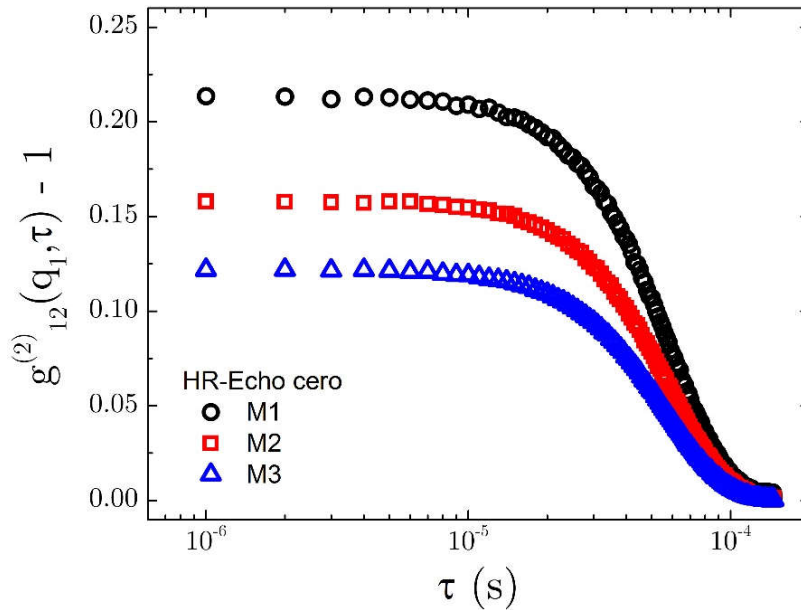


Fig. 4.1.6 HR-Echo cero de cada una de las muestras en escala log-lin. En círculos el de la muestra M1, en cuadrados de la M2 y en triángulos de M3.

Realmente, la caída que presenta el eco cero es la misma que la de una 3D-ICF tradicional medida durante 40 s con la muestra rotando a la misma velocidad utilizada para obtener los ecos. En la figura Fig. 4.1.5 se muestra este importante hecho para la muestra M2, donde se grafican las 3D-ICF's medidas por BF, 3DDLS convencional (rotando a 3.03 Hz) y el eco cero (puntos en el grafico del eco cero han sido omitidos para claridad en la figura). Esto implica que *el factor de coherencia puede ser estimado de forma rápida en experimentos convencionales de 3DDLS simplemente rotando la muestra a velocidades de un par de Hz*. En el recuadro de la figura Fig. 4.1.5 se presenta un resumen de los factores de coherencia medidos por los tres métodos vistos anteriormente. Los cuadrados representan la altura del eco cero, los círculos son los estimados rotando la muestra a la velocidad de los ecos en experimentos convencionales de 3DDLS y las cruces corresponden a las mediciones usando BF.

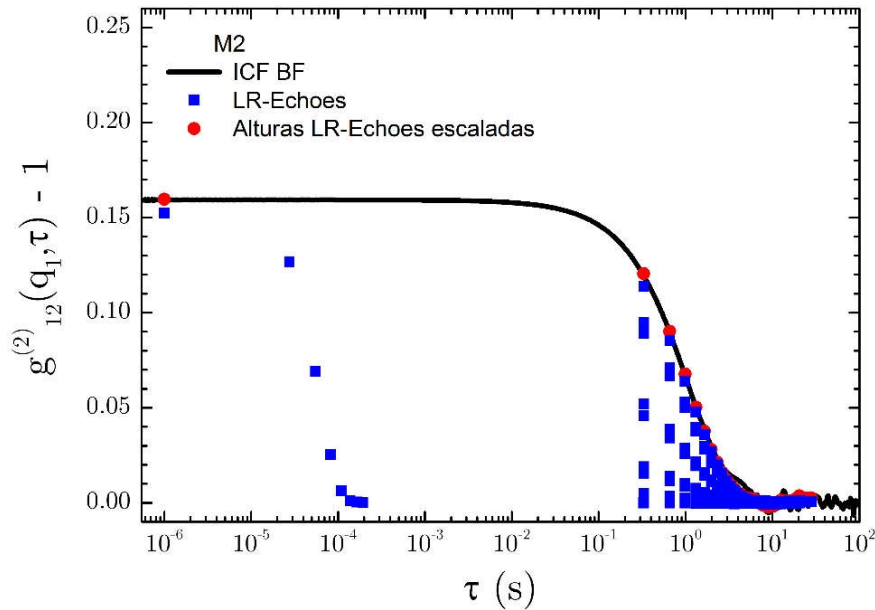


Fig. 4.1.7 Muestra M2. ICF BF (línea), LR-Echoes tomados con un S_t de $27.5 \mu s$ (cuadrados) y las alturas de estos escaladas con las obtenidas de los HR-Echoes (círculos).

Finalmente veremos que es posible acceder a tiempos de retardo más largos y lograr un acuerdo semejante al alcanzado entre la dinámica del sistema y las alturas de los HR-Echoes. Como se dijo anteriormente en el protocolo de medición, es necesario obtener los LR-Echoes utilizando el S_t de $27.5 \mu s$ con el cual es posible acceder a un tiempo de retardo máximo de $\tau_{max} = S_t * (2^{20} - 1) \approx 29 s$. En la figura Fig. 4.1.7 se muestran la 3D-ICF usando BF (línea), los LR-Echoes (cuadrados) y las alturas de estos escaladas (círculos) con la altura de los HR-Echoes de la muestra M2. El primer eco (no el medio eco inicial) aparece centrado en $\tau = 0.3296425 s$ que es el periodo de rotación. Se observa claramente que las alturas de los LR-Echos no siguen la dinámica del sistema pero que al escalarlas con las obtenidas de los HR-Echoes se logra que el acuerdo con la 3D-ICF obtenida de BF sea muy bueno. Los resultados finales obtenidos para cada una de las muestras se presentan en la figura Fig. 4.1.8.

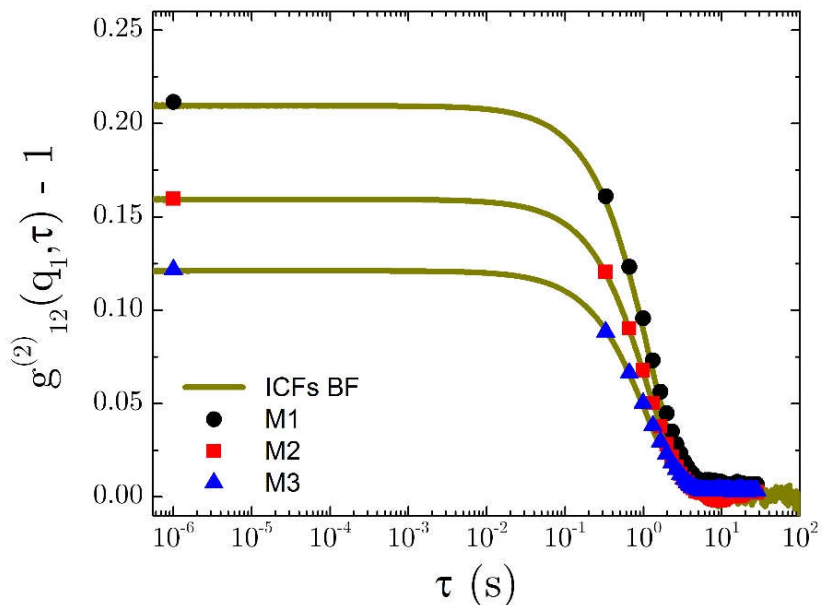


Fig. 4.1.8 Mediciones 3DDLS-Echo escalando las alturas de los LR-Echoes con las obtenidas de los HR-Echoes. En círculos los resultados para la muestra M1, cuadrados para la M2 y triángulos de la M3. Las líneas corresponden a las 3D-ICFs de BF mostradas en la figura Fig. 4.1.2.

4 · 2 RESINA EPÓXICA

En sistemas rígidos los dispersores se encuentran “congelados”, por lo que al realizar experimentos con la técnica 3DDLS-Echo, cada vez que se regresa al punto inicial de la medición el mismo *speckle* ilumina el detector, lo que implica que los campos se encuentran totalmente correlacionados. Esto provocará que todos los ecos tengan la misma altura, es decir, la 3D-ICF es constante para todo τ .

Una resina epóxica o poliepóxido es un polímero termoestable que se torna rígido cuando se mezcla con un agente catalizador o endurecedor. Las resinas epóxicas más

frecuentes son producto de una reacción entre epiclohidrina y bisfenol. Para este sistema no fue necesario añadir PL para realizar los experimentos de 3DDLS-Echo ya que la conformación y heterogeneidades presentes en la muestra de resina seca producen suficiente señal de dispersión. Además, a diferencia de nuestro sistema ergódico de PL en glicerol puro, donde las ICF's BF fueron utilizadas para extraer el radio hidrodinámico de las partículas para demostrar que los ecos siguen la dinámica de sistemas fluidos, con este sistema rígido nuestro único interés es demostrar que los ecos mantienen alturas constantes a tiempos de retardo grandes, cuando la técnica 3DDLS-Echo es utilizada en sistemas completamente arrestados. Previamente, por supuesto, se ha verificado que se obtuvieran ecos de buena calidad como el que se muestra en el recuadro de la figura Fig. 4.2.1.

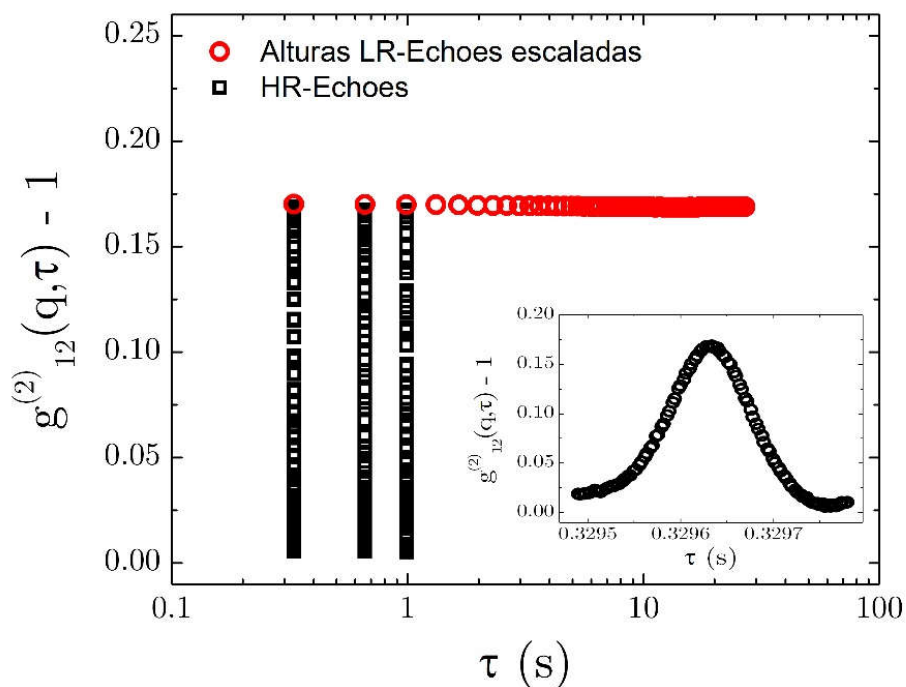


Fig. 4.2.1 Resina epóxica. En círculos las mediciones 3DDLS-Echo escalando las alturas de los LR-Echoes con las obtenidas de los HR-Echoes. En cuadrados los HR-Echoes. Recuadro: HR-Echo.

Los experimentos se llevaron a cabo con los mismos parámetros que los utilizados para la muestra de PL en glicerol con la diferencia de que para este sistema se promedian 50 mediciones independientes de 20 s segundos cada una para los HR-Echoes y 25 de 150 s cada una para los LR-Echoes. Realizamos más mediciones que en los sistemas anteriores para promediar un mayor número de configuraciones ya que, al ser un sistema completamente rígido, cada medición solo ve una pequeña fracción del espacio fase. En la figura Fig. 4.2.1 mostramos los resultados obtenidos, donde se observa que la 3D-ICF en los tiempos definidos por la técnica 3DDLS-Echo es constante para todo τ . Aquí cabe mencionar que estimar adecuadamente 3D-ICF's de sistemas tan rígidos con mediciones convencionales de 3DDLS resultaría imposible.

Capítulo 5

3DDLS-Echo. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Una vez validado el funcionamiento del dispositivo 3DDLS-Echo, se presentan los resultados del estudio de tres sistemas no ergódicos de interés tanto industrial, microreología óptica pasiva de geles fijadores para el pelo, como de ciencia básica, dinámica de suspensiones coloidales concentradas y matrices poliméricas.

5 · 1 MATRICES POLIMÉRICAS: GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida, poliA, reúnen una serie de propiedades idóneas para los experimentos de dispersión de luz con partículas trazadoras: compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos, transparencia, rigidez controlable, porosidad y elasticidad. La poliA se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida (AA) y la bis-acrilamida (BisA) (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por persulfato de amonio (40 mg/100 ml) y con tetrametiletiléndiamina (TEMED, 160 μ l/100 ml) como catalizador. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de AA para que polimerice. Las cadenas de poliA son entrecruzadas al azar por la BisA, formándose así una red de porosidad y rigidez bastante uniforme que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y la concentración de los monómeros.

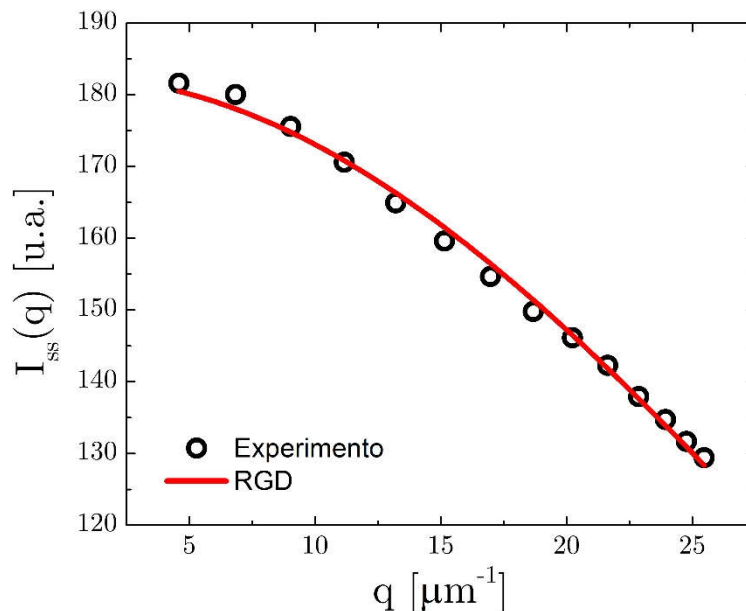


Fig. 5.1.1 Factor de forma de la muestra G2. En círculos se muestra el perfil de intensidades obtenido de la muestra G2. La línea representa el ajuste con teoría RGD para partículas homogéneas utilizando un radio de 53 *nm*.

Las partículas inmersas en la red formada por los geles de poliA estarán localizadas cerca de posiciones promedio fijas, teniendo permitido ejecutar movimiento Browniano limitado alrededor de estas posiciones. En virtud de esta localización de los dispersores, el sistema se encuentra atrapado en una región restringida del espacio fase, o subconfiguración, cuya localización y extensión están determinados por las posiciones promedio de los dispersores y la magnitud de sus desplazamientos, respectivamente. Debido al arresto parcial de las partículas las 3D-ICFs (*3 Dimensional Intensity Cross-correlation Function*) de estos sistemas presentarán una meseta o *plateau* a tiempos de retardo grandes. En este trabajo hemos cuidado que las partículas utilizadas no interactúan directamente con la matriz poliméricas, buscando así no afectar sus propiedades dinámicas y mecánicas intrínsecas.

Estos sistemas son un excelente ejemplo para demostrar la capacidad de la técnica

3DDLS-Echo para determinar alturas de *plateaus* de sistemas no ergódicos parcialmente arrestados. Para este estudio se diseñan dos muestras hechas con partículas de látex (PL) de 55 nm de radio (como trazadoras) inmersas en gel de poliA. Para obtener un gel rígido la concentración total en peso de AA es $[AA] + [BisA] = 2.5\%$ y la de entrecruzante es $f_{BisA} = [BisA]/([BisA] + [AA]) \approx 1.5\%$. Antes de añadir el persulfato para iniciar la reacción de polimerización, se agregan las PL suspendidas en agua al pregel para dispersarlas homogéneamente. Se preparan dos muestras: G1 con una fracción de volumen de PL $\phi_1 = 0.002$ y G2 con $\phi_2 = 0.004$. Los experimentos se realizan a un ángulo de dispersión de 90° y a una temperatura de 20°C . Las interacciones entre partículas para las concentraciones trabajadas son despreciables como lo confirman los experimentos de dispersión estática de luz, en la Fig. 5.1.1 se presenta el perfil de intensidades para la muestra más concentrada sobre el que se ajusta una curva con la teoría de Rayleigh-Gans-Debye (RGD) arrojando un radio de 53 nm.

La configuración experimental para las mediciones con la técnica 3DDLS-Echo es similar a la utilizada en el capítulo 4. En la tabla T 5.1.1 se presenta un resumen de los parámetros utilizados. Nuevamente, el número de mediciones obedece al hecho de que es necesario promediar diferentes configuraciones del sistema. La frecuencia de rotación es $f_r = 3.03 \text{ Hz}$ y la magnitud del vector de dispersión es $q = 18.7 \mu\text{m}^{-1}$ ($\theta = 90^\circ, \eta_{\text{agua}} = 1.332$). En la Fig. 5.1.2 se muestran los resultados obtenidos para estas dos muestras. Los símbolos sólidos corresponden a las mediciones 3DDLS-Echo de la muestra G1 y los símbolos huecos de la muestra G2. En cuadrados los HR-Echoes y en círculos las alturas de los LR-Echoes escaladas por las obtenidas con los HR-Echoes. En el recuadro se muestra uno de los HR-Echoes obtenidos para la muestra G2.

Tipo de medición	S_t [μs]	W_s	# Medidas	Duración [s]
HR	1	294	50	20
LR	27.5	14	15	300

T. 5.1.1 Parámetros de la medición 3DDLS-Echo para las muestras de geles de poliA y suspensiones coloidales concentradas (sección 5.2).

La dinámica del sistema se obtiene calculando NISF (*Normalized Intermediate Scattering Function*) para las alturas escaladas de los LR-Echoes usando la ecuación (3.3.6), donde $g_{12,r}^{(1)}(q, \tau) = 1$, con β_{12} dado por la altura del eco cero de la medición HR. En la Fig. 5.1.3 se presentan las NISF's de ambas muestras, en símbolos sólidos para G1 y en símbolos huecos para G2. Se puede observar que estas dos muestras un buen acuerdo,

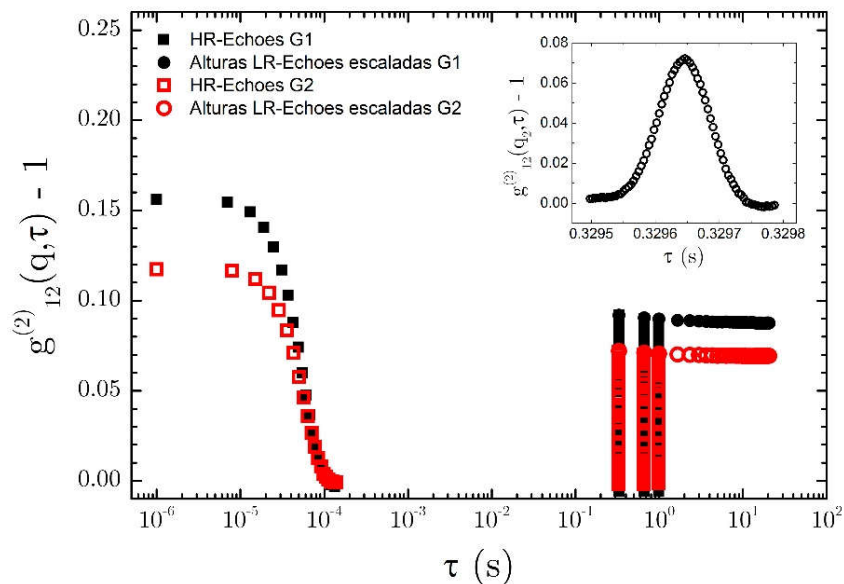


Fig. 5.1.2 3DDLS-Echoes de las muestras G1 (símbolos sólidos) y G2 (símbolos huecos). Los cuadrados son los HR-Echoes completos, mientras que los círculos son las alturas de los LR-Echoes escaladas por las encontradas con la medición HR-Echoes. En el recuadro se muestra unos de los HR-Echoes de la muestra G2.

hecho esperado debido a que la dinámica de ambos sistemas es equivalente puesto que la única diferencia entre ellos es la concentración de partículas y a que éstas no interactúan, como se demuestra en la Fig. 5.1.1. Para corroborar este resultado se calculó la 3D-ICF para la muestra G1 por el método de Pusey-Van Megen aplicado al dispositivo 3DDLS [5]. Se realizaron mediciones de 1800 s en 16 puntos distintos de la muestra. La NISF calculada a través de este método se muestra (línea) en la Fig. 5.1.3. Como se puede observar el acuerdo entre la técnica 3DDLS-Echo y Pusey-Van Megen es excelente en todo el rango temporal accedido por los ecos. Entonces, podemos afirmar que *en nuestro montaje experimental la técnica 3DDLS-Echo representa un modo rápido y preciso para determinar alturas de plateaus de sistemas parcialmente arrestados de forma “absoluta” ya que no tenemos que escalar por factores arbitrarios.*

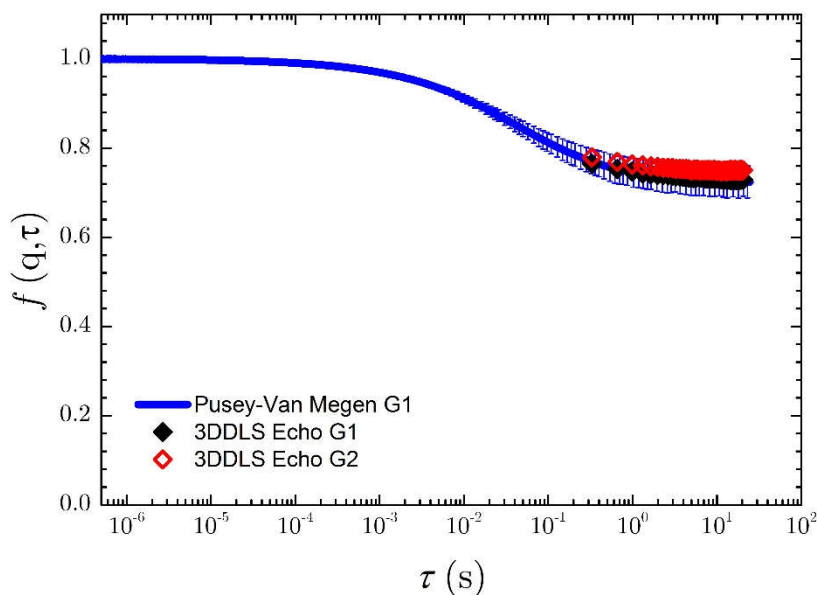


Fig. 5.1.3 Método Pusey-Van Magen. Función intermedia de dispersión normalizada obtenida a partir de: método Pusey-Van Magen para G1 (línea) y 3DDLS-Echo para G1 (símbolo sólido) y G2 (símbolo hueco).

5 · 2 SOLUCIONES COLOIDALES CONCENTRADAS CARGADAS

Este sistema es usado para verificar la utilidad de la técnica 3DDLS-Echo para el estudio de sistemas con dinámica que presenta dependencia angular. El sistema está hecho con partículas de dióxido de silicio (SiO_2) a una concentración tal que las partículas ven restringido su movimiento debido a la repulsión electrostática entre partículas originada por la carga neta adquirida al ser suspendidas en un medio polar y a las altas fracciones de volumen a las que se encuentran en la muestra. Bajo estas condiciones las partículas se encuentran en configuraciones donde ven restringido su movimiento alrededor de posiciones promedio de equilibrio por lo que ocurre una ralentización de los procesos dinámicos, tanto del movimiento de las partículas como de reordenamientos colectivos, lo que trae como consecuencia NISF's con alturas de *plateaus* que dependen de la escala de longitud (vectores de dispersión, q) a la que se realicen los experimentos [58].

Para este estudio se elabora una muestra con partículas de SiO_2 de radio 130 nm , con índice de refracción efectivo $n = 1.46$. Las partículas de sílice se dispersan en una mezcla en peso de dimetilsulfóxido (DMSO) de 55% y agua desionizada de 45%, a un $\text{pH} \approx 7$, que nos da un índice de refracción similar al de las partículas para evitar dispersión múltiple extrema y que al mismo tiempo ralentiza la sedimentación de éstas. Además, esta mezcla garantiza que los grupos silanol (Si-OH) situados en la superficie de las partículas puedan disociarse y así éstas puedan adquirir una carga efectiva al agregar resinas intercambiadoras de iones. La muestra se preparó a una concentración de $\phi = 0.01$, en una celda cilíndrica de cuarzo de 5 mm de radio interior, a la que se agregaron las resinas intercambiadoras de iones (Amberlite IRN 150, Fluka). Para evitar que la

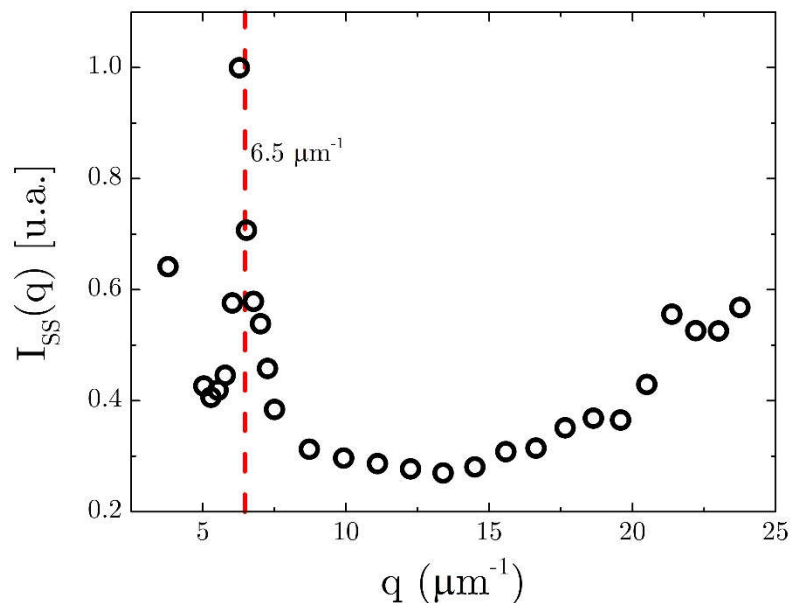


Fig. 5.2.1 Perfil de intensidades de partículas cargadas de dióxido de silicio en una mezcla en peso de DMSO del 55% y agua del 45%. Se observa un máximo en el perfil para $q \approx 6.5 \mu m^{-1}$.

muestra evaporara, esta fue sellada con película de parafina y cinta de teflón [58]. Los experimentos con la técnica 3DDLS-Echo se realizan a $20^{\circ}C$, con $f_r = 5.9 Hz$ para 5 vectores de dispersión distintos. Los parámetros de medición son los mismos que se usaron para los geles de poliA y que se resumen en la tabla T. 5.1.1.

Primero se realiza un pequeño estudio estructural de la muestra, para esto se mide el perfil de intensidades $I_{SS}(q)$, como se muestra en la Fig. 5.2.1. Con el fin de reducir los tiempos de medición y de explorar un número grande de configuraciones espaciales del sistema, las mediciones se realizaron rotando la muestra a una velocidad alta. Se observa que $I_{SS}(q)$ presenta un máximo para $q_{max} = 6.5 \mu m^{-1}$. Los resultados obtenidos con la técnica 3DDLS-Echo se presentan en la Fig. 5.2.2 y representan los puntos para los cuales $\tau > 0.2 s$ de la NISF de cada vector de dispersión medido, es decir, nos ayuda a

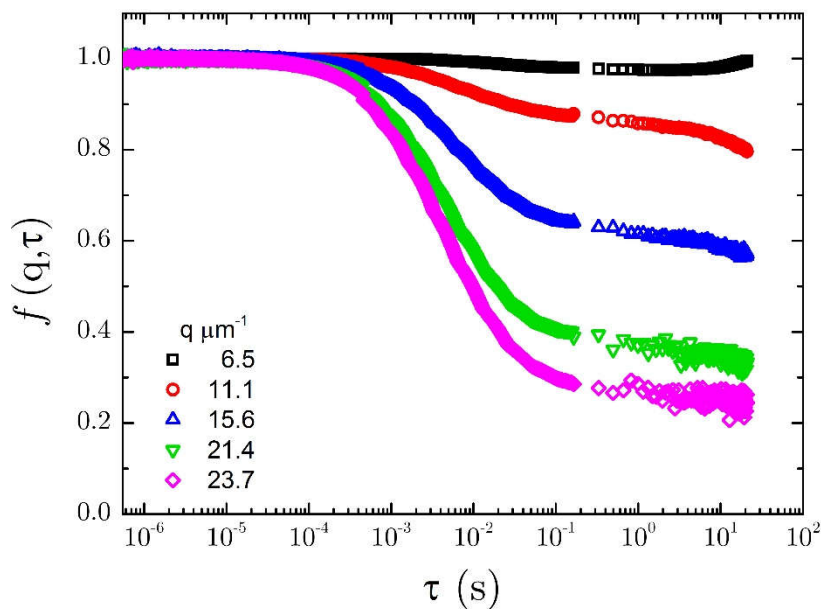


Fig. 5.2.2 Factores de estructura dinámicos normalizados en función de q de una muestra de partículas de dióxido de silicio suspendidas en una mezcla en peso de 55% DMSO por 45% agua desionizada a una concentración $\phi = 0.01$. La contribución de la técnica 3DDLS-Echo a los NISF son los puntos para los cuales $\tau > 0.2$ s.

definir los *plateaus*. Podemos observar claramente la dependencia en q de las NISF's, la cual, como se mencionó antes, afecta principalmente a la altura de los *plateaus*; parámetro que está relacionado con el grado de restricción en el movimiento de las partículas. Así, vemos que la correlación temporal es máxima (*plateau* más alto) para $q = q_{max}$, lo que quiere decir que a esta escala de longitud las partículas se encuentran tan restringidas en su movimiento que los campos eléctricos dispersados por ellas están altamente correlacionados a diferentes tiempos de retardo, hecho esperado ya que la posición del máximo en la $I_{SS}(q)$ está relacionado con la escala promedio de localización de las partículas en la suspensión. Ahora, el hecho de que la altura del *plateau* disminuye conforme q aumenta nos dice que a esas escalas de longitud el sistema sufre reacomodos estructurales.

5 · 3 MICROREOLOGÍA ÓPTICA PASIVA

En la naturaleza y en la industria existen gran cantidad de sistemas para los cuales es interesante o necesario determinar sus propiedades mecánicas. Actualmente, métodos microreológicos son usados para caracterizar todo tipo de sistemas (soluciones poliméricas, geles, pinturas, cosméticos, productos alimenticios, etc.) a frecuencias y escalas espaciales inalcanzables para instrumentos mecánicos, e. g., la microreología ha sido usada para caracterizar las propiedades mecánicas de sistemas tan pequeños como el citoplasma en células vivas [50-53], algo imposible de lograr por métodos mecánicos. Existen dos tipos de microreología: la pasiva y la activa. La microreología pasiva utilizada en este trabajo se basa en un análisis de la frecuencia del movimiento difusivo de partículas coloidales de prueba incrustadas en el material de interés [54] y, la microreología activa, en donde el movimiento de las partículas de prueba es debido a fuerzas externas (no difusivo) como la de un campo electromagnético [55] o mediante pinzas ópticas [56].

El principio teórico en el que se basa la microreología es una generalización de la relación de Stokes-Einstein entre el movimiento traslacional de las partículas de prueba y las propiedades mecánicas locales del medio que las contiene, es decir,

$$G^*(\omega) = \frac{k_B T}{i\omega\pi a \langle \Delta R^2(\omega) \rangle} \quad (5.3.1)$$

donde $\langle \Delta R^2(\omega) \rangle$ es el MSD (*Mean Square Displacement*) dependiente de la frecuencia, obtenido del de tiempos de retardo $\langle \Delta R^2(\tau) \rangle$ (ver capítulo 2), ω es la frecuencia de corte, $k_B T$ es la energía térmica, y a es el radio de las partículas. G^* representa el

módulo complejo de corte, cuya parte real, $G'(\omega)$, es el módulo elástico o de almacenamiento y la parte imaginaria, $G''(\omega)$, corresponde al módulo viscoso o de pérdida [57].

$$G'(\omega) = G(\omega) \cos \left[\frac{\pi\alpha(\omega)}{2} \right] \quad (5.3.2)$$

$$G''(\omega) = G(\omega) \sin \left[\frac{\pi\alpha(\omega)}{2} \right] \quad (5.3.3)$$

con

$$G(\omega) = \frac{k_B T}{\pi a \langle \Delta R^2(1/\omega) \rangle \Gamma[1 + \alpha(\omega)]}, \quad (5.3.4)$$

en donde $\langle \Delta R^2(1/\omega) \rangle$ es la magnitud de $\langle \Delta R^2(\tau) \rangle$ evaluado en $\tau = 1/\omega$. La ley de potencias local $\alpha(\omega)$ está dada por $|\partial \ln \langle \Delta R^2(\tau) \rangle / \partial \ln \tau|_{\tau=1/\omega}$ y Γ denota la función gamma.

El MSD se obtiene a partir de la NISF, $f(q, \tau)$, (ver capítulo 2). Para una suspensión diluida las mediciones DLS dan información sobre el movimiento promedio de una sola partícula. El desplazamiento de una partícula en movimiento Browniano es una variable aleatoria con una distribución de probabilidad Gaussiana, y su MSD está dado por $\langle \Delta R^2(\tau) \rangle = 6D_0\tau$, y la NISF por $f(q, \tau) = \exp(-q^2 D_0 \tau)$. Así tenemos

$$f(q, \tau) = \exp \left(\frac{-q^2 \langle \Delta R^2(\tau) \rangle}{6} \right) \quad (5.3.5)$$

de donde

$$\langle \Delta R^2(\tau) \rangle = -\frac{6 \ln[f(q, t)]}{q^2}. \quad (5.3.6)$$

Así, con la ecuación (5.3.6) se puede determinar el MSD de las partículas trazadoras en el sistema de interés a partir de mediciones de DLS. En sistemas donde los tiempos de caída de la NISF son cortos, los experimentos convencionales de 3DDLS serán suficientes para realizar un buen estimado de la misma. Pero en aquellos sistemas donde los tiempos de relajación son del orden de decenas de segundos, se requiere llevar a cabo mediciones de horas o días -si los sistemas presentan además no ergodicidad-. En esta parte hemos utilizado la técnica 3DDLS-Echo para acortar significativamente el tiempo de medición y determinamos los módulos G' y G'' por microreología, los cuales son comparados con los medidos por reología mecánica.

El sistema estudiado en esta aplicación de la técnica 3DDLS-Echo es de interés industrial. Se trata de un gel fijador para el cabello de la marca Babaria (España) y como trazadoras se utilizan PL de 196 nm de radio hidrodinámico (IkerLab, España). La muestra se prepara integrando las partículas trazadoras en el gel batiendo con ayuda de una plancha magnética durante 10 min a una velocidad moderada y con el recipiente tapado para evitar lo más posible la evaporación. El gel con partículas se deposita en una celda de cristal de 8 mm de diámetro interior y se sella con película de parafina y cinta de teflón. La muestra se deja reposar por 24 hrs para que las burbujas que se forman durante el batido se retiren a la superficie del gel. La concentración utilizada de PL es $\phi = 0.00132$.

Las partículas fueron caracterizadas en nuestro laboratorio por DLS, el radio hidrodinámico encontrado es de 194 ± 5 nm, el cual vemos es muy cercano al reportado por el fabricante y es el que usamos para el cálculo de los módulos viscoelásticos. En la tabla 5.3.1 se presenta un resumen de la configuración de la medición en su totalidad, es

decir, para *Brute Force* (BF) y 3DDLS-Echo. El método BF es utilizado para definir $f(q, \tau)$ para los tiempos no accesibles a la técnica 3DDLS- Echo, $\tau < 0.33$ s.

<i>Tipo de medición</i>	S_t [μ s]	W_s	$\#$ <i>Medidas</i>	<i>Duración</i> [s]
BF	---	---	1	3600
HR	1	294	30	40
LR	27.5	14	20	120

T 5.3.1 Configuración de las medidas para obtener $f(q, \tau)$. Para la región de tiempos cortos ($\tau < 0.33$ s) de $f(q, \tau)$ se utiliza el método de BF y en la de tiempos largos ($\tau \geq 0.33$ s) la técnica 3DDLS-Echo.

Los experimentos se realizaron a una temperatura constante de 25°C y a un ángulo de dispersión $\theta = 60^\circ$ ($q = 13.22 \mu m^{-1}$, $\eta_{gel} = 1.331$). En la Fig. 5.3.1 se muestra la $f(q, \tau)$ construida con las mediciones de BF (cuadrados) y 3DDLS-Echo (círculos). En el recuadro de la misma figura se muestra el desplazamiento cuadrático medio calculado de acuerdo con ecuación (5.3.6). Una vez obtenido el MSD se utilizan las ecuaciones (5.3.2) a (5.3.4) para determinar los módulos elástico y viscoso de nuestra muestra. En la Fig. 5.3.2 se presentan los resultados obtenidos de microreología, haciendo distinción entre la zona de los módulos definida por la región de la NISF que fue obtenida por el método BF (línea discontinua) de la obtenida por la técnica 3DDLS-Echo (línea continua). Se hace la comparación de nuestros resultados con los encontrados por reología mecánica (símbolos) y se observa que el acuerdo entre los dos métodos es muy bueno, sobre todo en la región definida por los ecos, la cual cubre aproximadamente dos terceras partes de las frecuencias accesibles con reología mecánica. Además, vemos que con la microreología se accede a cerca de 3 décadas adicionales, frecuencias altas, a las probadas con la reología convencional.

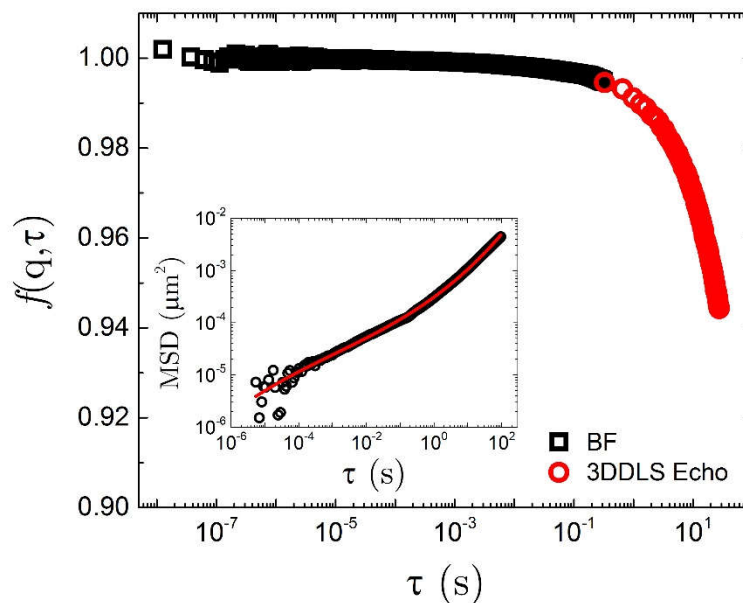


Fig. 5.3.1 Función intermedia de dispersión normalizada para la muestra de gel fijador de cabello (Babaria, España) dopado con PL de 194 nm de radio hidrodinámico como trazadoras. En cuadrados la sección correspondiente a la medición BF y en círculos la obtenida por medio de la técnica 3DDLS-Echo. En el recuadro se muestra el MSD correspondiente.

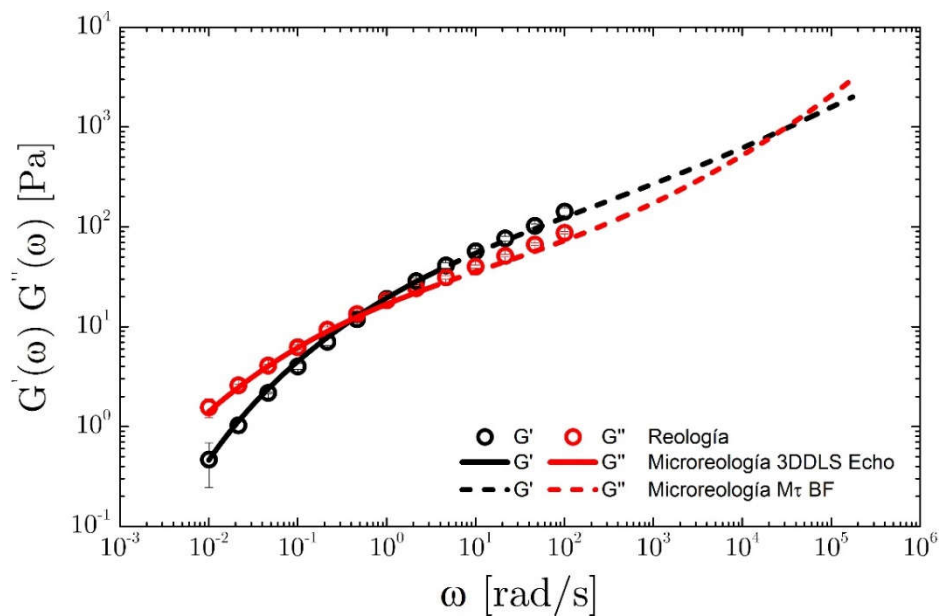


Fig. 5.3.2 Módulo elástico y viscoso de gel fijador de cabello calculados por: reología mecánica (símbolos) y microreología (líneas continua y discontinua).

Finalmente, el excelente acuerdo observado entre los módulos obtenidos con la técnica 3DDLS-Echo y aquellos de reología mecánica representa una prueba adicional de la estabilidad alcanzada en nuestro montaje experimental y de la capacidad de la técnica 3DDLS-Echo para promediar una gran cantidad de configuraciones en un corto tiempo en sistemas no ergódicos.

Nuestros resultados constituyen una alternativa experimental novedosa para acceder a propiedades mecánicas de materiales suaves turbios mediante el uso de técnicas ópticas no invasivas.

Capítulo 6

CARACTERIZACIÓN DE PATÓGENOS

6 · 1 INTRODUCCIÓN

Durante años, los microbiólogos han usado información empírica (forma, color, olor y textura) del crecimiento de colonias bacterianas, como una primera aproximación en el proceso de identificar el tipo de bacteria en estudio. Sin embargo, esta valoración no provee suficiente información para una identificación concluyente. Por lo tanto, el siguiente paso consiste en realizar evaluaciones bioquímicas y/o genéticas las cuales suelen ser lentas y, en la mayoría de los casos, costosas. Los experimentos de DLS son una buena opción para simplificar y abaratar el proceso de identificación de patógenos, sobre todo de aquellos con motilidad. DLS es una técnica no invasiva de caracterización de propiedades dinámicas de materiales blandos que no requiere grandes cantidades de muestra además de poseer una alta sensibilidad. Con DLS es factible extraer información dinámica en pocos minutos sobre el movimiento de las bacterias como son la velocidad promedio, coeficiente de difusión y porcentaje de bacterias en movimiento. Todas estas características hacen de DLS una herramienta perfecta para el estudio de sistemas biológicos vivos, *active matter*, como son las bacterias. Uno de los primeros estudios dirigidos a probar el potencial de DLS para la caracterización del movimiento bacteriano fue realizado por Nossal, Chen y Lai en 1971 [59]. Ellos fueron capaces de medir

la distribución de velocidades de la bacteria *Escherichia coli* K_{12} . Sin embargo, no existieron avances significativos en los siguientes 40 años debido a las dificultades técnicas y de modelado físico del movimiento de las bacterias. Es en años recientes, de 2010 a la fecha, con el desarrollo e implementación de la técnica tipo SALS (*Small Angle Light Scattering*) conocida como DDM (*Differential Dynamic Microscopy*) [3], que el estudio de bacterias con DLS toma un nuevo impulso [3, 4, 60, 61].

En esta tesis los experimentos de DLS se realizan con la técnica experimental HNFLS (*Heterodyne Near Field Light Scattering*) (capítulo 3). Las técnicas DDM y HNFLS son técnicas muy similares, la principal diferencia es la fuente de luz utilizada, DDM utiliza luz blanca mientras que HNFLS luz altamente coherente (láser). Cabe mencionar que, hasta donde conocemos, nuestro trabajo es el primero en proponer el uso de HNFLS para la caracterización de bacterias. En nuestro estudio se realizan dos tipos de análisis. Primero, se calcula la función intermedia de dispersión normalizada, NISF (*Normalized Intensity Correlation Function*), sobre la cual se ajusta un modelo teórico para extraer los parámetros dinámicos como velocidad promedio y coeficiente de difusión. Sabemos que la NISF está influenciada por procesos de relajación en la densidad a escalas de longitud del orden de $l = 2\pi/q$. Por lo tanto, algo importante a considerar es que a partir de valores de l cercanos al tamaño de la bacteria (diámetro hidrodinámico), mecanismos dinámicos como la precesión del cuerpo de las bacterias [62], entre otros aún no entendidos, contribuyen fuertemente al decaimiento de la NISF, lo cual complica de forma significativa la extracción adecuada de parámetros como la velocidad. Entonces, dado que valores de l grandes implican valores del vector de dispersión, q , pequeños, las técnicas SALS son necesarias para poder caracterizar de forma adecuada la dinámica de estos organismos. El segundo análisis realizado es conocido como TRS (*Time Resol-*

ved Structuration), y nuestro trabajo representa la primera vez que TRS se implementa para el estudio de sistemas biológicos vivos como las bacterias. TRS tiene como base la técnica de análisis TRC (*Time Resolved Correlation*), desarrollada por Luca Cipelletti *et al.* en 2003 [63]. TRC surgió como una herramienta que permite discriminar, temporalmente hablando, entre dinámica homogénea y dinámica heterogénea, de sistemas como suspensiones y emulsiones concentradas, espumas y geles, a través del llamado *grado de correlación*. La idea básica en TRC, y que aplica igual para TRS, es que para sistemas con dinámica homogénea los *speckles* en las imágenes fluctúan suavemente en el tiempo. Por el contrario, en sistemas con dinámica heterogénea el patrón de *speckles* evoluciona discontinuamente debido a que los cambios en las configuraciones de la muestra fluctúan abruptamente en el tiempo. Estos dos métodos de análisis (modelo sobre NISF y TRS) son complementarios y consistentes entre ellos. De estos análisis se extrae suficiente información para distinguir entre las bacterias aquí estudiadas.

Resumiendo, en este trabajo doctoral se presenta el primer estudio dirigido a identificar patógenos mediante DLS. Las bacterias estudiadas son: dos cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica que infecta humanos (*EHEC FN253* y *EHEC FN51*), *Escherichia coli* enteropatógena que infecta conejos (*EPEC E22wt*) y *Salmonella typhimurium* (*S. typhi*). Además, contamos con una mutante isogénica de *EPEC E22wt* la cual no expresa el flagelo (*EPEC E22 fliC*). Esta mutante es un excelente sistema modelo para estudiar el comportamiento del cuerpo de las bacterias bajo movimiento browniano puro. La técnica experimental usada es HNFLS y se realizan dos tipos de análisis: ajustando un modelo a la NISF y mediante TRS.

6 · 2 DINÁMICA DE LA MOTILIDAD BACTERIANA

Las bacterias hacen uso de diversos mecanismos para desplazarse de un lugar a otro en busca de condiciones favorables para alimentarse y reproducirse. Algunos de los mecanismos menos comunes son los movimientos vibratorios y los de torsión, en los que cambian la densidad de su cuerpo. La forma de movilidad más utilizada por las bacterias es, sin duda, la propulsión flagelar. En esta, la bacteria se desplaza utilizando una serie de apéndices móviles, llamados flagelos, formados básicamente por tres componentes: motor reversible, codo y filamento. Estos tres elementos dan origen a una estructura única, completamente diferente a cualquier otro sistema utilizado por cualquier otro ser vivo. El flagelo tiene una longitud de entre 6 y 10 μm y puede alcanzar una velocidad de entre 200 y 1,000 *rpm*. El combustible utilizado por el motor es un flujo de protones que resulta del metabolismo de la bacteria.

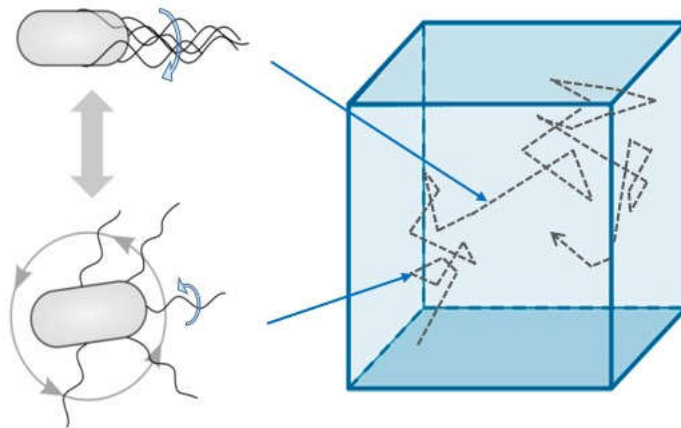


Fig. 6.2.1 Motilidad bacteriana. Cuando los flagelos se agrupan rotan en sentido anti-horario y la bacteria nada en línea recta. Después de un tiempo promedio de aprox. 1 s los flagelos cambian el sentido de rotación y se desagrupan, provocando que la bacteria se agite por un tiempo promedio de aprox. 0.15 s. La alternancia de estos movimientos da lugar a un desplazamiento tipo caminante aleatorio.

Lo que se conoce sobre movilidad bacteriana proviene de estudios hechos con *E. coli*, actualmente se tiene un muy buen entendimiento de su comportamiento, por lo que se ha convertido en el paradigma del movimiento bacteriano. Se sabe que cuando sus flagelos rotan en sentido anti-horario (esto viendo desde los flagelos hacia el cuerpo, es decir, desde atrás), estos se agrupan y propulsan a la bacteria para un nado en línea recta [13]. Después de nadar por un intervalo de tiempo promedio de ~ 1 s suceden cambios dramáticos en el sistema de propulsión, los motores flagelares cambian el sentido de rotación a horario y los flagelos se desagrupan, provocando que la bacteria entre en un nuevo estado de movimiento, *agitación*. La bacteria permanecerá en este estado durante un intervalo de tiempo promedio de ~ 0.1 s, para regresar nuevamente al estado de nado, pero en una nueva dirección elegida de forma aleatoria [13]. Esta alternancia entre nado y agitación da origen a un movimiento tipo *caminante aleatorio*, ilustrado en la Fig. 6.2.1.

Finalmente, al hacer un seguimiento de la velocidad en el tiempo se observa que el cambio de nado a agitación es de forma abrupta, mientras que el de agitación a nado se da gradualmente durante un periodo de aceleración, tal y como se observa en la forma de los mínimos de la velocidad en la Fig. 6.2.2 a). Haciendo un análisis más detallado del mecanismo de transición agitación-nado, se observa que este cambio gradual en la velocidad se debe a que los flagelos, después de haber estado en agitación, transitan por diversas configuraciones (formas adoptadas por los filamentos de los flagelos) de forma desordenada. Una vez los flagelos se han sincronizado pueden reagruparse y propulsar nuevamente a la bacteria en línea recta [13]. Al intervalo temporal que va de nado a nado recibe el nombre de *intervalo de reconsolidación*, mostrado en la Fig. 6.2.2 b).

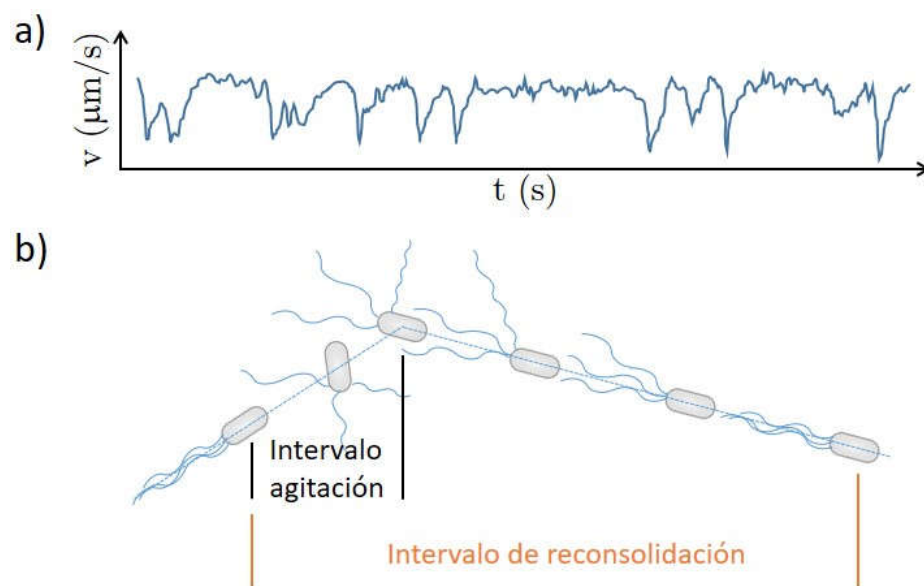


Fig. 6.2.2 Motilidad bacteriana, detalle. a) Seguimiento en el tiempo de la velocidad de una bacteria. Las fluctuaciones en la velocidad son debidas a la naturaleza del movimiento bacteriano, nado-agitación-nado, donde cada mínimo corresponde a un evento de agitación. b) Detalle de la transición nado-nado. Después del intervalo de agitación a los flagelos les toma un tiempo sincronizarse y reagruparse, lo que explica los periodos de aceleración en a).

<i>Cepa</i>	<i>Descripción</i>	<i>Serotipo</i>	<i>Referencia</i>
<i>E22 wt</i>	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena, infecta conejos	O103:H2	Camguilhem and Milon, 1989 [66]
<i>E22 ΔfliC</i>	<i>E22 fliC::km</i> ; flagelina negativa	O103:H2	Salazar-Gonzalez et. al., 2011 [67]
<i>EHEC FN253</i>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica EDL933	O157:H7	Riley et al., 1983 [68]
<i>EHEC FN51</i>	EHEC EDL933	O157:H7	Este estudio
<i>S. typhi.</i>	<i>Salmonella typhi</i> LEM- 03010	9,12,Vi:d:-	Viera-Pérez, 2012 [69]

T. 6.3.1 Cepas bacterianas caracterizadas mediante DLS. Contamos con 4 cepas distintas de *E. coli* y una de *S. typhi*. *E22ΔfliC* es una mutante de *E22wt* que no expresa el flagelo.

6 · 3 CULTIVOS BACTERIANOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Con la finalidad de estandarizar el proceso de medición, los cultivos se realizaron siguiendo el mismo protocolo para cada una de las cepas bacterianas utilizadas. Las cepas utilizadas se describen en la tabla 6.3.1. Todas las cepas se preservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caldo Luria-Bertani (LB) con 15 % de glicerol. Antes de cualquier ensayo, las cepas se reactivaron en agar LB a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16-18 *hrs*.

El protocolo utilizado para el cultivo de las cepas bacterianas y preparación de las muestras se describe a continuación:

- Una vez reactivadas las bacterias se sembró una colonia aislada en 3 *ml* de caldo LB y se crecieron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 13 *hrs* (ON, *overnight*).
- Pasado este tiempo se diluyó el ON en 3 *ml* de caldo LB, ajustando a una densidad óptica (a 600 *nm*, DO_{600}) de 0.05 y a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitando a 150 *rpm* por un tiempo t_a , tal que la DO_{600} al momento de cosecharlas esté entre 0.6 y 0.8. Esta DO_{600} nos garantiza que las bacterias se encuentran en la fase exponencial de su crecimiento. El tiempo t_a depende de la velocidad de crecimiento de cada una de las cepas. Para las cepas aquí estudiadas se obtuvo que $65 \leq t_a \leq 85\text{ min}$.
- Las muestras se prepararon a partir de la solución anterior ajustando la DO_{600} a 0.3. Esto se hace diluyendo la solución de bacterias en *buffer de motilidad* (BM) [4] (6.2 *mM* K_2HPO_4 , 3.8 *mM* KH_2PO_4 , 67 *mM* NaCl , 0.1 *mM* EDTA, $\text{pH} = 7.0$).
- Inmediatamente después de preparadas las diluciones, éstas se colocan en

celdas de cuarzo rectangulares de 1 mm de camino óptico y una capacidad de ≈ 1.8 ml. Las celdas se sellan ajustando sus tapas con parafina para evitar filtraciones y/o evaporación de la muestra.

La DO_{600} a la que se realizan los experimentos es ≈ 0.4 debido a que la muestra se deja reposar antes de realizar las mediciones (ver siguiente sección). Esta DO_{600} corresponde a $\approx 5 \times 10^8$ células/ml o ≈ 0.06 % en fracción de volumen. En nuestro protocolo las bacterias no son lavadas para retirar el medio en el que crecieron, sino que la DO_{600} a la que se realizan los experimentos se obtiene agregando BM, con el fin de evitar dañar los flagelos, lo cual se logra dados los altos porcentajes de bacterias en movimiento que se obtienen al hacer los análisis.

6 · 4 HNFLS: PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La descripción del dispositivo HNFLS se encuentra en el capítulo 3, aquí se verán algunos parámetros importantes a considerar para la interpretación de los resultados y, posteriormente, se presenta el protocolo experimental utilizado.

El detector con el que cuenta instrumento es un sensor CMOS de tamaño de pixel $5.2 \times 5.2 \mu m$ ($m \times m$). La magnificación, $M = 20X$, está dada por el objetivo de microscopio utilizado. A la cantidad $k = M/m$ se le conoce como frecuencia espacial de muestreo y, junto con el tamaño de las imágenes (L) en pixeles, define la magnitud del vector de dispersión mínimo $q_{min} = 2\pi k/L$ accesible en nuestro montaje para la configuración usada en los experimentos. El tamaño de las imágenes al procesarlas es de 480×480 pixeles con lo que $q_{min} \approx 0.05 \mu m^{-1}$, sin embargo, el mínimo utilizado es $q_{min} \approx$

$0.6 \mu m^{-1}$ debido a que para vectores más pequeños el estimado de la función de estructura $D(q, t)$, resulta ruidoso. Esto se debe principalmente a dos razones: 1) a la poca cantidad de pixeles que forman los anillos definidos por los q 's más pequeños, lo que provoca que la estadística para estos vectores de dispersión sea muy pobre y, 2) a que tanto el ruido mecánico como el óptico se aprecian más en estos valores de q 's. Ahora, la magnitud del vector de dispersión máximo está definida por

$$q_{max} = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \left(\frac{1}{2} \sin^{-1} \left(\frac{AN}{n} \right) \right). \quad (6.4.1)$$

donde AN es la apertura numérica del objetivo y n es el índice de refracción del medio en el que se encuentran las bacterias (aprox. igual al del agua). En la práctica los experimentos se analizan hasta un valor de q_{max} menor al máximo teórico definido (95%), esto con el fin de evitar vectores de dispersión mal estimados por problemas propios de las fronteras de las lentes. Bajo esta consideración utilizamos un $q_{max} \approx 4.5 \mu m^{-1}$. Por lo tanto, *el rango de vectores de dispersión estudiados es $0.6 \leq q \leq 4.5 \mu m^{-1}$* . Dado que la resolución en q con la que se calculan las funciones de correlación es de $\approx 0.06 \mu m^{-1}$, tenemos entonces que *el número de funciones de estructura calculadas en cada análisis es de ≈ 71* .

Ahora, de la región iluminada en la muestra por el haz incidente (diámetro $D \approx 10 \text{ mm}$) se colecta información (luz dispersada) de una fracción de diámetro D^* (ver capítulo 3). D^* es el campo de visión del dispositivo, definido por $D^* = NC/M$, donde NC es el número de campo de la lente L_T (22 mm). Tenemos entonces que $D^* = 1.1 \text{ mm}$, el cual nos define un área de visión (AV) de $9.5 \times 10^5 \mu m^2$. Al multiplicar el AV por el camino óptico de la celda se define el volumen desde el cual se colecta señal, llamado

volumen de dispersión, $VD = 9.5 \times 10^8 \mu m^3$. Así, considerando la concentración a la que se encuentran las muestras, se puede estimar que *en nuestros experimentos censamos el movimiento de $\approx 10^5$ bacterias simultáneamente*.

El protocolo experimental consta de dos partes. Primero tenemos la medición, donde se toma de un video de la señal dispersada por la muestra y, segundo, el procesamiento de ese video, para tener las imágenes que serán utilizadas para extraer la información dinámica a través de los métodos analíticos.

Los experimentos se realizaron a 22 ± 0.2 °C bajo el siguiente protocolo de medición:

- La muestra se colocó en el instrumento y se dejó reposar durante 60 *min*. Este tiempo es necesario para que la muestra termalice para evitar así corrientes de convección, las cuales pueden verse claramente en el patrón de *speckles*. *Durante este tiempo la DO_{600} cambia de 0.3 a ≈ 0.4 , los experimentos se realizan a esta densidad óptica.*
- Se capturan 720 s de video con un tamaño de imagen de 640×480 pixeles, en formato RGB a 109.4 *fps*. El video resultante cuenta con 79640 imágenes y pesa ≈ 60 Gb. Se tiene especial cuidado en elegir un tiempo de exposición que no provoque pixeles saturados. Se adquiere video y no una secuencia de imágenes directamente porque, con el video, se obtiene un mayor *frame rate*.
- Para cada cepa se realizaron los experimentos por triplicado (excepto de *E22 Δ fliC*, de la que se realizó solo uno), partiendo cada vez de una colonia nueva para la preparación de la muestra.

Pasamos del video a una secuencia de imágenes del plano rojo (plano con mayor señal dado el color del láser utilizado), como se describe a continuación:

- Con el programa *VirtualDub* pasamos el video a una secuencia de imágenes RGB.
- Se separan los planos de color usando el programa *ImageJ*. Los planos de color verde y azul son desechados, guardando solamente la secuencia de imágenes del plano rojo en escala de grises.

Cabe mencionar que el último punto no sería necesario de contar con una cámara monocromática, ya que desde el punto uno tendríamos la secuencia de imágenes necesaria para realizar los análisis.

6 · 5 MÉTODOS ANALÍTICOS

6.5.1 Modelo para la NISF

En nuestro esquema de análisis se accede a la NISF $f(q, t)$, a partir de la función de estructura $D(q, t)$, vía la ecuación (3.1.6); donde $B(q)$, se determinó realizando un estudio estático de la señal dispersada, $A(q)$ corresponde a la altura del *plateau* que define la función de estructura a tiempos largos, menos $B(q)$. En la Fig. 6.5.1 se muestra una NISF representativa de uno de los sistemas bacterianos aquí estudiados (*Salmonella. tiphy*), obtenida de medidas de HNFLS a un vector de dispersión $q = 0.605 \mu m^{-1}$. En el recuadro se muestra la función de estructura correspondiente a la medición de este sistema.

El cálculo de $D(q, t)$ -ver sección 3.1.1, capítulo 3- se lleva a cabo dividiendo la secuencia de imágenes en 5 secciones, cada una de 12000 imágenes, es decir, se analizan 109.7 s. Las secciones son elegidas de tal forma que no exista traslape temporal entre ellas. Así tenemos 5 experimentos independientes (diferentes tiempos de inicio), sin necesidad de capturar 5 videos y hacer sus respectivos procesamientos.

Antes de introducir el modelo físico considerado para análisis de nuestros resultados, es conveniente entender la dinámica colectiva de las bacterias en las muestras, es decir, como se mueven en grupo y considerando que un porcentaje de ellas no tendrán la capacidad de nadar, ya sea porque están en reposo o porque tienen los flagelos dañados por la manipulación al preparar las muestras. En suspensión todas las bacterias presentan movimiento difusivo (MD) debido al movimiento Browniano. Ahora, arriba se describió la mecánica del movimiento de una sola bacteria, vimos que ésta puede transitar por diferentes estadios durante la etapa de reconsolidación. Durante una medición se colecta información de $\approx 10^5$ bacterias, por lo tanto, en cada instante un gran número de ellas se encontrarán en agitación, otras tantas en la etapa final de reconsolidación (aceleración) y, finalmente, las que se encuentren en el intervalo de nado (velocidad constante), de las cuales diremos que presentan movimiento balístico, MB. Ahora, esta velocidad constante no es la misma para todas las bacterias, es decir, tenemos una distribución de velocidades $P(\nu)$ con isotropía en la dirección. Además, dado que las bacterias se encuentran en un medio continuo acuoso, incluso las bacterias en MB están sometidas al choque constante con las moléculas del medio, lo cual les otorga una componente difusiva a considerar.

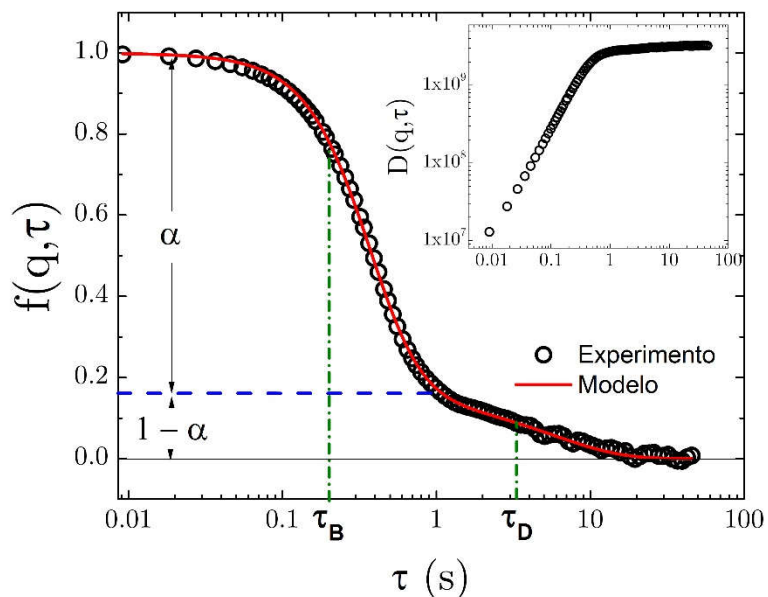


Fig. 6.5.1 Ajuste sobre NISF obtenida de una muestra de *Salmonella typhi*. (símbolos) para $q = 0.605 \mu m^{-1}$. Se ven las dos caídas, con tiempos característicos τ_B y τ_D , presentes en una muestra de bacterias donde una proporción de ellas está en MB y, mientras la otra ($1 - \alpha$), está en MD.

Tal modelo de ajuste es conocido [64], y está dado por:

$$f(q, \tau) = (1 - \alpha)e^{-q^2 D \tau} + \alpha e^{-q^2 D \tau} \int_0^{\infty} P(\nu) \frac{\sin(q \nu \tau)}{q \nu \tau} d\nu, \quad (6.5.1)$$

donde α es la fracción de bacterias en MB y D el coeficiente de difusión. Vemos que el primer término es puramente difusivo y está pesado por el prefactor $(1 - \alpha)$, que representa la fracción de bacterias en MD. Mientras que el segundo término contiene una parte que depende de la velocidad, al mismo tiempo posee un factor difusivo, resultado de que las bacterias están en todo momento interactuando con las moléculas del medio. Finalmente, este segundo término está pesado por el número de bacterias en MB, α . Trabajos previos [59, 64] sugieren que $P(\nu)$ es una función de distribución sesgada

(asimétrica). Usando una distribución de Schultz,

$$P(\nu) = \frac{\nu^Z}{Z!} \left(\frac{Z+1}{\bar{\nu}} \right)^{Z+1} \exp \left[-\frac{\nu}{\bar{\nu}} (Z+1) \right], \quad (6.5.2)$$

donde Z está relacionada con la varianza σ^2 de $P(\nu)$ mediante $\sigma = \bar{\nu}(Z+1)^{-1/2}$, tenemos [65]

$$\int_0^{\infty} P(\nu) \frac{\sin(q\nu\tau)}{q\nu\tau} d\nu = \left(\frac{Z+1}{Zq\bar{\nu}\tau} \right) \frac{\sin(Z \tan^{-1} \Lambda)}{(1+\Lambda^2)^{Z/2}}, \quad (6.5.3)$$

donde $\Lambda = (q\bar{\nu}\tau)/(Z+1)$. Este modelo tiene la limitante de no considerar el estado de agitación de las bacterias. Sin embargo, proporciona muy buenos estimados de la velocidad promedio, fracción de bacterias en nado y del coeficiente de difusión. En la Fig. 6.5.1 (*línea roja*) se muestra un ejemplo de ajuste con el modelo descrito anteriormente, sobre datos experimentales de *Salmonella typhi*. obtenidos en un vector de dispersión de $0.605 \mu m^{-1}$. Se ven las dos caídas características de un sistema con dos procesos dinámicos que ocurren a escalas de tiempo distintas. El primero y más rápido, con un tiempo característico $\tau_B = 1/q\bar{\nu}$, corresponde a las bacterias en MB. El segundo y más lento, con tiempo característico $\tau_D = 1/q^2 D$, está relacionado con las bacterias en MD. Los ajustes se realizan sobre todas las funciones, en el rango de q definido en la sección anterior ($0.6 \leq q \leq 4.5 \mu m^{-1}$), lo que nos deja con un vector de tiempos característicos en función de q para cada proceso ($\tau_D(q), \tau_B(q)$). A partir de estos resultados obtenemos gráficos en escala log-log de $\tau_B(q)$ y $\tau_D(q)$ vs q . Tenemos así:

$$\tau_B(q) = 1/q\bar{\nu}, \quad \tau_D(q) = 1/q^2 D \quad (6.5.4 a)$$

$$\log(\tau_B(q)) = -\mathbf{1}\log(q) - \log(\bar{\nu}), \quad \log(\tau_D(q)) = -\mathbf{2}\log(q) - \log(D) \quad (6.5.4)$$

$$\bar{\nu} = 10^{-b_B} \quad (6.5.5 \ a) \quad \text{y} \quad D = 10^{-b_D}. \quad (6.5.5 \ b)$$

En esta representación obtenemos líneas rectas para cada uno de los movimientos, ilustradas por las ecuaciones (6.5.4). La pendiente del proceso balístico es -1 y de la ordenada al origen se determina la velocidad promedio de nado, ecuación (6.5.5 a). Por otro lado, para el proceso difusivo la pendiente es -2 y de la ordenada al origen se determina el coeficiente de difusión, ecuación (6.5.5 b). Con el coeficiente de difusión y la relación de Stokes-Einstein, ecuación (2.4.13), se calcula el radio hidrodinámico, a , de las bacterias en MD.

6.5.2 Time Resolved Structuration, TRS

TRS es un método de análisis que permite detectar y cuantificar heterogeneidades dinámicas. El método se basa en el análisis de la evolución temporal del patrón de *speckles* generado por la luz dispersada por la muestra. Esta evolución temporal se cuantifica mediante el *grado de estructuración*, $s_I(\mathbf{q}, t_w, \tau)$. $s_I(\mathbf{q}, t_w, \tau)$ se obtiene a partir de diferencias entre dos imágenes (en el espacio real), capturadas a los tiempos t_w y $t_w + \tau$, $\Delta_i(\mathbf{x}, t_w, \tau) = i(\mathbf{x}, t_w + \tau) - i(\mathbf{x}, t_w)$. Estas diferencias se calculan en función de los tiempos en los que se toma la imagen inicial, t_w , y para diferentes tiempos de retardo, τ , entre las dos imágenes. Después se obtiene el espectro de potencia de la diferencia de las intensidades, con lo que tenemos el *grado de estructuración* para todo q ,

$$s_I(\mathbf{q}, t_w, \tau) = |\Delta I(\mathbf{q}, t_w, \tau)|^2. \quad (6.5.6)$$

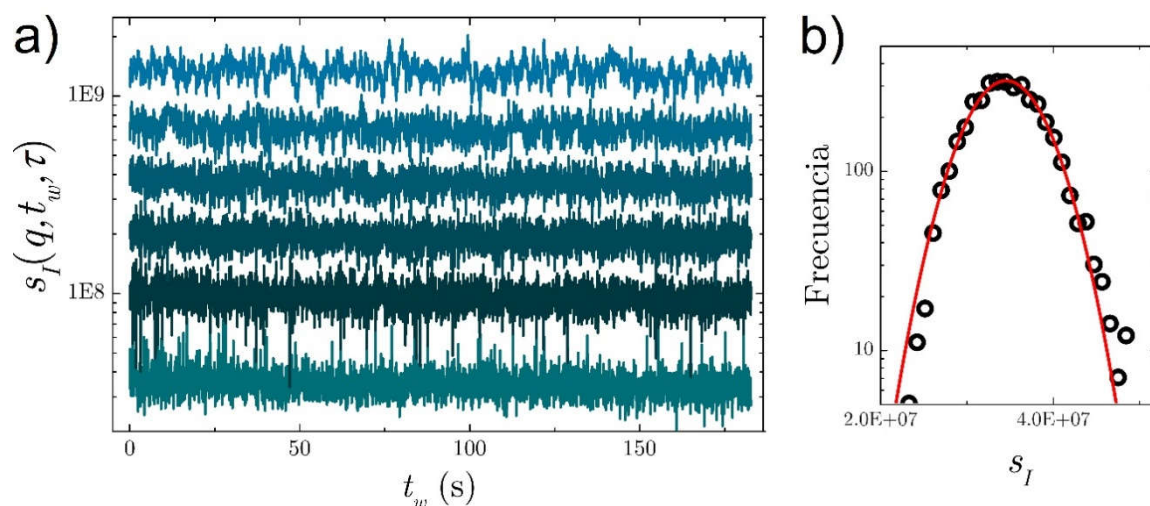


Fig. 6.5.2 a) Señal de TRS de un sistema Browniano de partículas de látex de 400 nm de diámetro en $q = 0.9572 \text{ mm}^{-1}$. Los tiempos de retardo son, de abajo hacia arriba, 0.009, 0.046, 0.119, 0.274, 0.649, 3.81 s. b) Curva de frecuencias (símbolos) de s_I para $\tau = 0.009$ s. La línea roja es un ajuste gaussiano.

Finalmente, se realiza un promedio angular para determinar $s_I(q, t_w, \tau)$ para cada vector de dispersión q que se desee. Como resultado del análisis TRS tenemos trazas como las mostradas en la Fig. 6.5.2 a). Estas trazas representan a $s_I(q, t_w, \tau)$ en función de t_w de una muestra de partículas de látex de 400 nm de diámetro, para cada uno de los tiempos de retardo, τ , estudiados en $q = 0.9572 \mu\text{m}^{-1}$. Los tiempos de retardo mostrados son, de abajo hacia arriba, 0.009, 0.046, 0.119, 0.274, 0.649, 3.81 s. Para discernir entre dinámica homogénea y heterogénea es necesario hacer un estudio estadístico de las trazas. En sistemas con dinámica homogénea $s_I(\mathbf{q}, t_w, \tau)$ fluctúa aleatoriamente alrededor de una media bien definida (las fluctuaciones son debidas al número finito de *speckles*, al ruido negro del sensor CMOS y al ruido de lectura). Por lo tanto, como una consecuencia del teorema de límite central $s_I(\mathbf{q}, t_w, \tau)$ debe presentar una función de distribución Gaussiana o, al menos muy cercana a ella, es decir, con asimetría (S_k , *skewness*) alrededor de cero, $S_k \approx 0$. Este comportamiento indica que las partículas se desplazan, en promedio, la misma distancia entre cualquier par de imágenes separadas

el mismo τ , independientemente del tiempo t_w al cual la imagen de referencia fue tomada. Movimientos con estas características son el movimiento Browniano y el nado de las bacterias en régimen diluido. En la Fig. 6.5.2 b) se muestra en símbolos la curva de frecuencias, para $\tau = 0.009$ s, del sistema estudiado en la Fig. 6.5.2 a). La línea roja es un ajuste gaussiano, el cual vemos en muy buen acuerdo sobre los datos experimentales.

Para sistemas con dinámica heterogénea las trazas presentaran curvas de frecuencia con cierto grado de asimetría, $S_k \neq 0$. Lo que indica que las partículas en el sistema experimentan cambios abruptos en su movimiento. El grado de asimetría dependerá del tipo de movimiento anómalo que genera las heterogeneidades dinámicas. Así, para sistemas como geles, espumas, emulsiones y suspensiones concentradas, las trazas $s_I(q, t_w, \tau)$ presentan fuertes fluctuaciones alrededor de una media oscilante. Esto es debido a micro-reordenamientos en el sistema, como lo muestran análisis hechos con TRC [63].

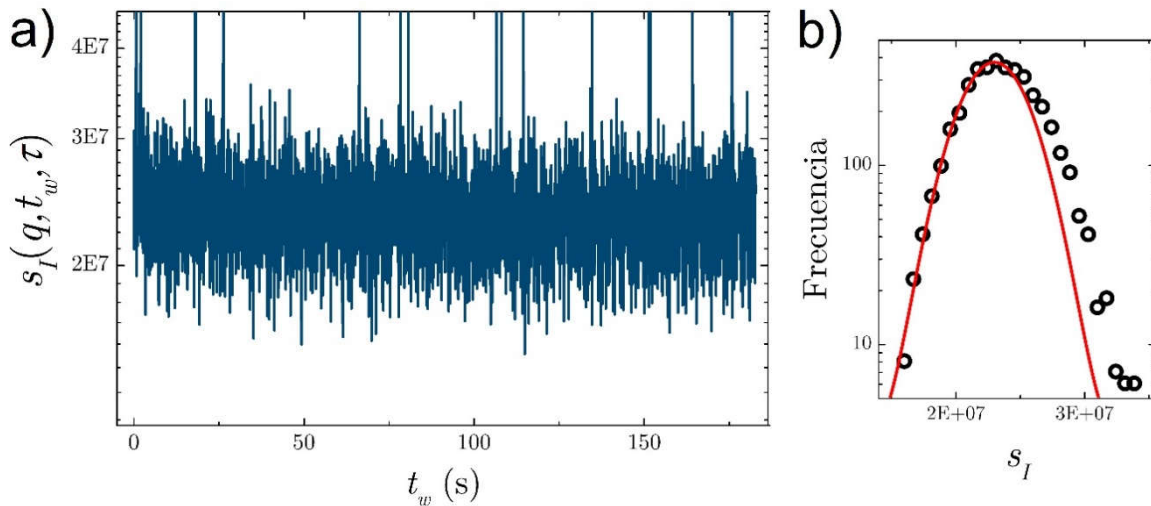


Fig. 6.5.3 TRS de una muestra de *Salmonella typhi*. a) $s_I(q, t_w, \tau)$ para $q = 0.9572$ y $\tau = 0.009$ s. b) Curva de frecuencias (símbolos). La curva roja es una gaussiana ajustada sobre los datos de la izquierda hasta el máximo.

En la Fig. 6.5.3 a) se muestra $s_I(q, t_w, \tau)$ para $q = 0.9572$ y $\tau = 0.009$ s, de una muestra de *Salmonella typhi*, mientras que en Fig. 6.5.3 b) tenemos en símbolos su curva de frecuencias. La curva roja es una gaussiana que se ajusta sobre los puntos de la izquierda (hasta el máximo). La asimetría es evidente y se cuantifica con $S_k = 54.83$ (al ajustar sobre todos los datos) En la sección 6.7 se hace un estudio del grado de asimetría en función de q y τ para las bacterias estudiadas en este trabajo y se especula sobre el movimiento que podría estar generando esta dinámica heterogénea.

6 · 6 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO, MICROSCOPIA Y ENSAYOS DE MOTILIDAD.

Para la caracterización biológica de las bacterias se realizaron 3 ensayos: *i*) cinéticas de crecimiento para verificar su viabilidad, *ii*) imágenes de microscopía, para tener confirmación visual de la forma de las bacterias y estimar su tamaño y, *iii*) ensayos de motilidad en geles suaves de agar bacteriológico, para corroborar que las bacterias tienen movimiento.

6.6.1 Cinéticas de Crecimiento

Las cinéticas de crecimiento se realizaron para verificar que la viabilidad de las bacterias fuera similar entre ellas bajo las condiciones utilizadas en este estudio, así como para comparar si la tasa de crecimiento de las bacterias pudiera influir en su motilidad.

El día previo al estudio se sembró una colonia aislada de cada cepa en 5 ml de caldo LB y se crecieron a 37°C por 17 h a 150 rpm. Después de este tiempo los cultivos ante-

riores se ajustaron a una DO_{600} de 0.2 en 5 ml de LB, y se crecieron a 37°C por 7.5 hrs a 160 rpm. Durante este tiempo se monitoreó la DO_{600} cada 1.5 hrs. El procedimiento anterior se llevó a cabo para cada bacteria en 3 experimentos independientes (3 mediciones por bacteria). En la Fig. 6.6.1 se muestran los resultados obtenidos. Podemos ver que todas las bacterias son viables bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio; sin embargo, podemos notar que hay ligeras variaciones en su tasa de crecimiento. Como es de esperarse la tasa de crecimiento de *EPEC E22wt* y *E22 fliC* son iguales a todos los tiempos, lo que nos indica que la mutación del flagelo no afecta su crecimiento. Para las cepas de *EHEC* encontramos inesperadamente una diferencia muy marcada entre *EHEC FN51* (que crece muy similar a las cepas de *EPEC*) y *EHEC FN253*, la cual a pesar de poseer el mismo serotipo que *EHEC FN51* presenta una menor tasa de crecimiento, sobre todo durante los tiempos iniciales $0 < t < 3$ hrs. Finalmente observamos que *Salmonella typhi* crece ligeramente menos que las cepas de *EPEC E22* después de 2 hrs.

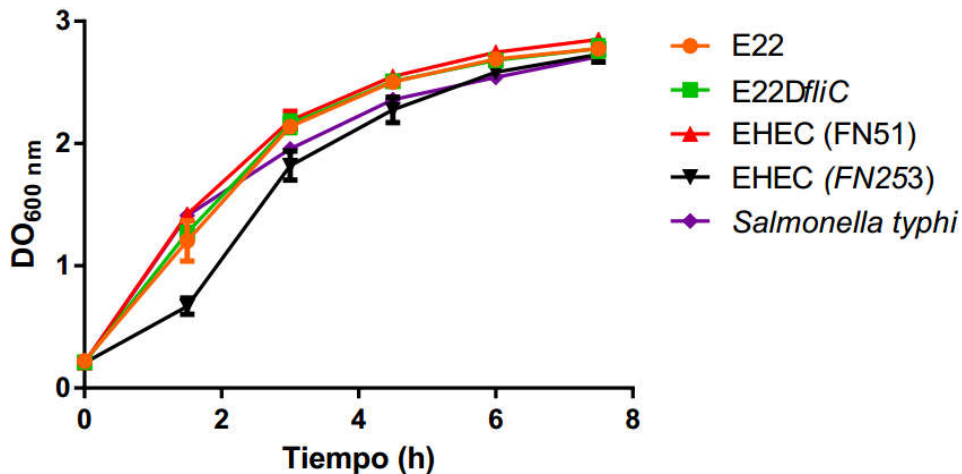


Fig. 6.6.1 Densidad óptica como función del tiempo. Todas las bacterias salvo *EHEC FN253* presentan una razón de crecimiento similar. *EHEC FN253* presenta una menor razón de crecimiento en el intervalo $0 < t < 3$ hrs.

6.6.2 Microscopía

Para visualizar y estimar el tamaño aproximado de las bacterias, se realizó una tinción simple con azul de metileno (Sigma, San Luis, MO). Para ello se limpiaron y desengrasaron portaobjetos de vidrio. Se colocaron tres gotas separadas de agua estéril sobre el portaobjetos y se colocó 1 μ l del cultivo bacteriano sobre la primera gota. Con ayuda de un asa bacteriológica estéril se homogenizó y se extendió la primera gota. Con otra asa estéril se hicieron diluciones de la primera gota hacia las otras dos gotas de agua, se extendieron y las preparaciones se dejaron secar al aire. Para fijar las preparaciones los portaobjetos se pasaron suavemente por calor 3 veces por 1 s. Una vez fijadas las bacterias, los portaobjetos se cubrieron con 1.5 ml de colorante de Azul de Metileno de Loeffler (azul metileno 0.3%, alcohol etílico 30%, hidróxido de potasio 0.01%) durante 2 min, se lavaron con abundante agua y se dejaron secar al aire. Las muestras se montaron con medio Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se sellaron con cubreobjetos para su observación con aceite de inmersión. Las muestras fueron fotografiadas en un microscopio confocal Leica TCSSP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) a una magnificación de 250X. Se tomaron cinco fotos de diferentes regiones donde las bacterias se observaban separadas y uniformes.

En la Fig. 6.6.2 se muestra una foto representativa de cada una de las bacterias. Se observa que todas son, aproximadamente, esfero-cilindros. El largo y ancho se mide para 50 bacterias por foto (250 en total) utilizando el programa FIJI (Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, ME). En la tabla 6.6.1 se presentan los resultados obtenidos.

Con estos resultados se confirma que *E22wt* y *E22 Δ fliC* tienen el mismo tamaño, ya

que, como se dijo antes, la segunda es mutante de la primera (no expresa los flagelos). En la tabla 6.6.1, las bacterias se ordenan de mayor a menor de acuerdo con el largo promedio estimado para cada una de ellas.

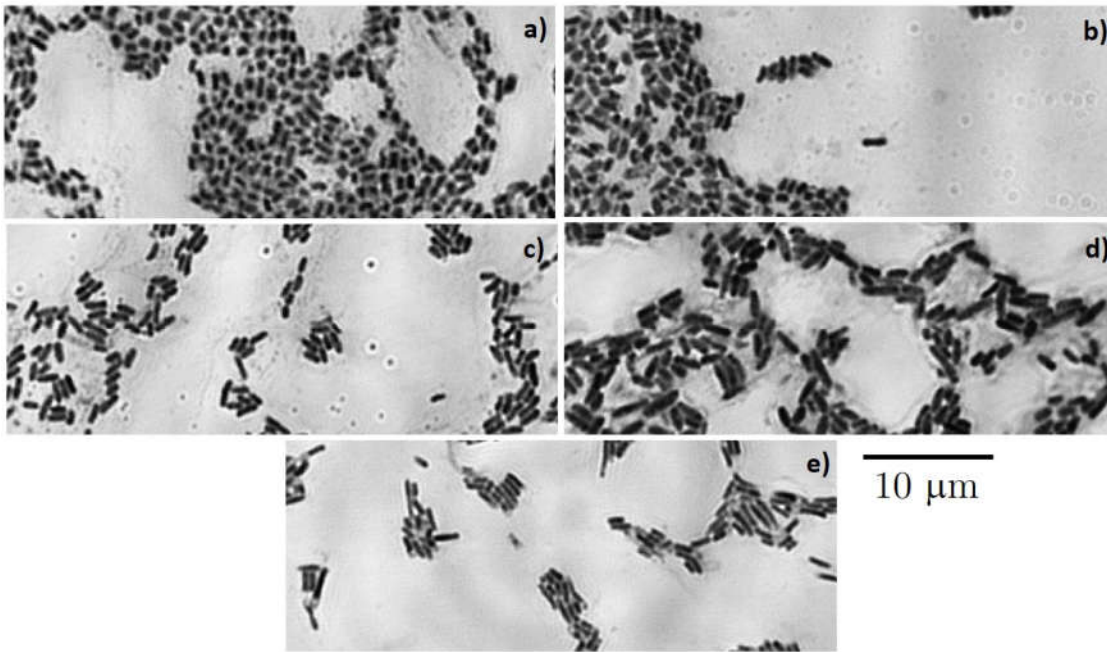


Fig. 6.6.2 Imágenes de las bacterias estudiadas tomadas por microscopía. a) *E22wt*, b) *E22ΔfliC*, c) *EHEC FN51*, d) *EHEC FN253*, e) *Salmonella typhi*.

<i>Cepa</i>	<i>Largo (μm)</i>	<i>Ancho (μm)</i>
<i>EHEC FN253</i>	1.717 ± 0.22	0.762 ± 0.10
<i>S. typhi.</i>	1.529 ± 0.18	0.458 ± 0.06
<i>EHEC FN51</i>	1.379 ± 0.17	0.566 ± 0.07
<i>EPEC E22wt</i>	1.154 ± 0.21	0.678 ± 0.08
<i>EPEC E22ΔfliC</i>	1.150 ± 0.13	0.681 ± 0.08

T. 6.6.1 Tamaños promedio de las bacterias estudiadas. El error corresponde a la desviación estándar. *EPEC E22wt* y *E22ΔfliC* tienen aprox. el mismo tamaño, ya que la segunda es una mutante de la primera cuya única diferencia es que no expresa el flagelo.

6.6.3 Ensayos de Motilidad

Para corroborar de manera visual que las bacterias estudiadas poseen movimiento, se realizaron ensayos de motilidad en geles suaves de acrilamida para permitir el libre desplazamiento de las bacterias y poder observar los halos de crecimiento. Para ello, el día previo al ensayo se sembró una colonia aislada de cada cepa en 5 ml de caldo LB y se crecieron a 37°C por 17 hrs a 150 rpm. Al cumplirse el tiempo los cultivos se colocaron en hielo por 20 min para detener su crecimiento, antes de determinar su DO₆₀₀. Para realizar las cinéticas de motilidad, se ajustó el cultivo de toda la noche a una DO₆₀₀ de 0.5 en 0.5 ml de PBS frío, se inocularon 1.5 µl de la dilución (realizando una punción) en el centro de una caja Petri de 90 mm con 20 ml de LB con 0.3% de agar y, se incubaron a 37°C. Se inoculó de esta manera para depositar en cada punción, aproximadamente, la misma cantidad de bacterias en cada caja. Se realizan 3 experimentos independientes y cada uno se hace por quintuplicado, es decir, se realizan 15 mediciones por bacteria. La primera medición de los halos, t_0 , se hace a las 3.5 hrs de iniciada la incubación. Las siguientes medidas se realizan cada 1.5 hrs a partir de t_0 . En la Fig. 6.6.3 se muestran fotografías tomadas durante el experimento para cada una de las bacterias al tiempo t_0 y $t_0 + 3$ hrs. El tamaño de los halos, en aquellas que lo presentan, es función de la dinámica de movimiento, el tamaño y razón de crecimiento de cada una de las bacterias. Para las bacterias que no tienen medio de propulsión el tamaño de la punción crece solo unos milímetros, debido a saturación.

En Fig. 6.6.4 se grafica el diámetro del halo de motilidad contra el tiempo de crecimiento de las bacterias. Vemos claramente que las bacterias *EPEC E22wt*, *S. typhi*. y *EHEC FN253* presentan movilidad como lo demuestran los diámetros crecientes de sus halos con el tiempo. *EPEC E22ΔfliC* presenta crecimiento prácticamente nulo, tal y como se

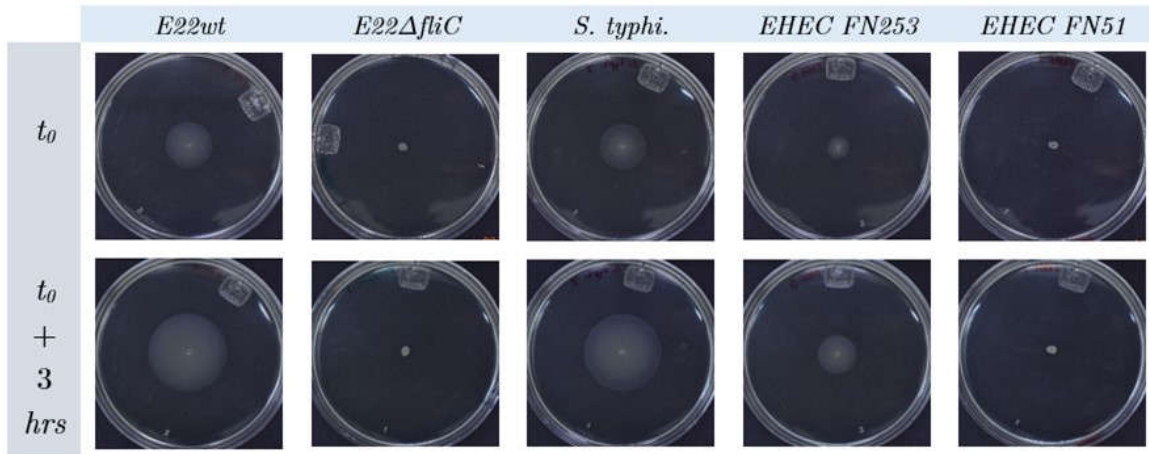


Fig. 6.6.3 Imágenes del estudio de motilidad. Las bacterias que tienen movimiento forman halos de crecimiento bacteriano. El tamaño del halo dependerá de la dinámica de movimiento, tamaño y razón de crecimiento de cada tipo de bacteria.

esperaba, pues como se dijo es una mutante carente de flagelos. *EHEC FN51* es un caso especial pues se esperaba tuviera movimiento y, vemos claramente que no es así. En el siguiente capítulo estos resultados son corroborados mediante DLS.

6 · 7 RESULTADOS DE DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de sistemas bacterianos mediante experimentos de DLS (*Dynamic Light Scattering*). Se realizan dos tipos de análisis: ajuste de un modelo sobre las NISF's (*Normalized Intermediate Scattering Functions*) y de TRS (*Time Resolved Structuration*). En las secciones 6.4 y 6.5 se expone a detalle la metodología experimental y los dos métodos de análisis.

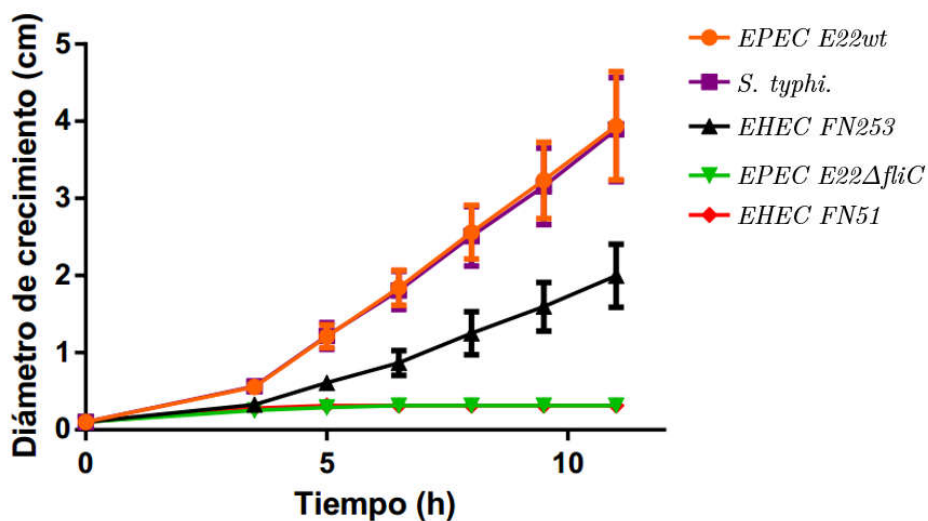


Fig. 6.6.4 Diámetro del halo contra el tiempo de crecimiento. *EPEC E22wt*, *S. typhi*. y *EHEC FN253* presentan movilidad y, *E22ΔfliC* y *EHEC FN51* carecen de ella.

Para TRS se presentan dos tipos de estudio: 1) para todas las bacterias en un solo valor del vector q , (TRS (q_r), $q_r = 0.9572$) y, 2) para las bacterias con movimiento balístico (MB) tomando 5 valores de q distribuidos en el rango de vectores de dispersión estudiado -subsección 6.7.7-. Para mostrar el comportamiento de un sistema modelo bajo los dos métodos de análisis utilizado, primero presentamos resultados obtenidos en una muestra de partículas de látex.

6.7.1 Partículas de Látex

Para este estudio la muestra se elaboró con partículas de látex de 400 nm de diámetro nominal (Invitrogen, Molecular Probes, USA), a una concentración en fracción de volumen de $\varphi = 5 \times 10^{-3}$ y suspendidas en agua ultra-pura. Las partículas fueron caracterizadas mediante la técnica 3DDLS arrojando un radio hidrodinámico $a = 188 \pm 12$ nm.

En la Fig. 6.7.1 tenemos la curva de tendencia de τ vs. q en escala log – log. Los tiempos son resultado de ajustar el modelo utilizado para las bacterias con $\alpha = 0$ (no hay nadadores en la muestra) sobre las NISFs. Vemos claramente que es una línea recta de pendiente ≈ -2 . No hay una parte balística ya que este sistema se encuentra en movimiento difusivo (MD) puro. El radio hidrodinámico estimado a partir del coeficiente de difusión es $a = 187 \pm 10 \text{ nm}$, el cual concuerda muy bien con el estimado mediante 3DDLS. En el recuadro presentamos el coeficiente de difusión, D , como función de q . La línea roja representa su valor promedio. El análisis TRS (q_r) muestra que $S_k \approx 0$ en todo el rango de tiempos de retardo τ , estudiados. El resultado se ve ilustrado por los triángulos invertidos en la Fig. 6.7.2.

6.7.2 *EHEC FN51*

Inicialmente se consideró que la bacteria *EHEC FN51* poseía MB pero, como se puede ver en la Fig. 6.6.3, esta no forma un halo de crecimiento, lo que implica que no cuenta con movimiento dirigido a pesar de ser una bacteria que posee los genes necesarios para sintetizar el flagelo. Esta falta de motilidad se corrobora con los resultados obtenidos de los experimentos de DLS. El ajuste del modelo sobre las NISF's arroja $\alpha \approx 0$, lo que significa que la muestra no posee bacterias en MB, observándose solo el tiempo característico difusivo, tal y como se ilustra en la Fig. 6.7.3. Al igual que las partículas de látex, para *EHEC FN51* obtenemos del análisis de TRS (q_r) que $S_k \approx 0$ para todo τ , mostrado por los triángulos hacia la izquierda en la Fig. 6.7.2.

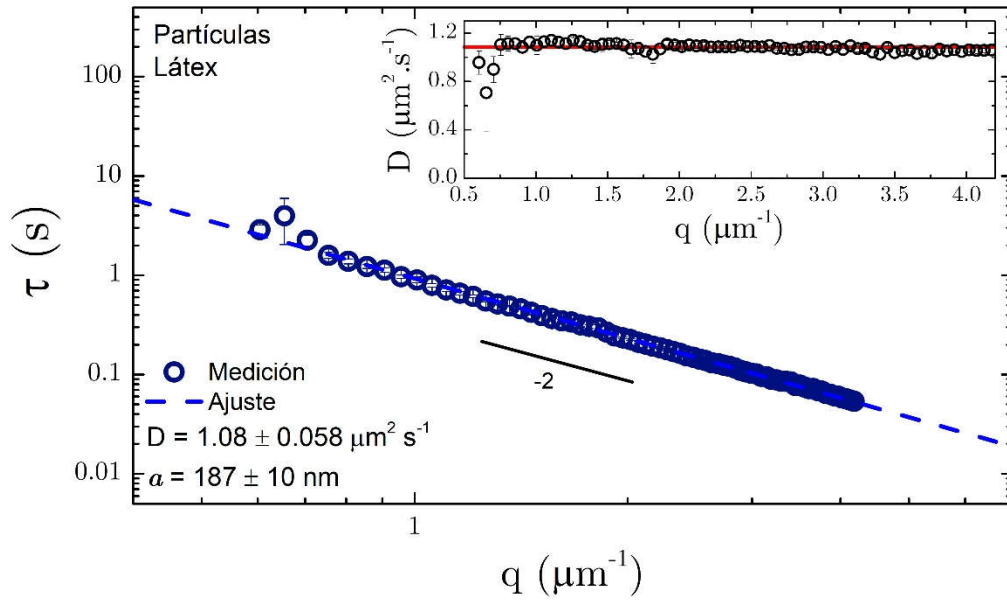


Fig. 6.7.1 τ vs. q del análisis de las NISF's de partículas de látex de 400 nm de diámetro nominal. En el recuadro el coeficiente de difusión, D , como función de q , donde la línea indica su valor promedio.

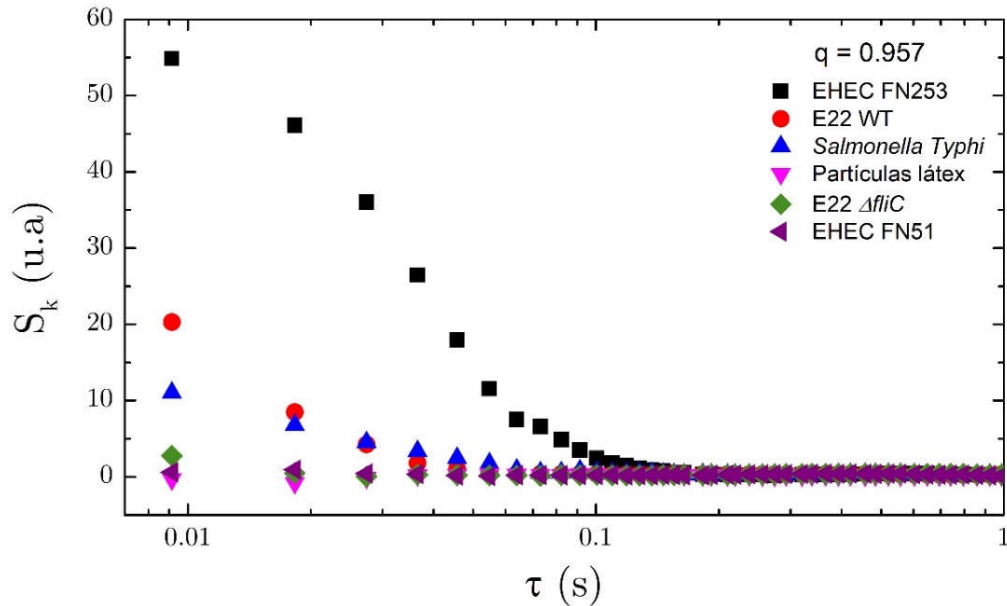


Fig. 6.7.2 S_k vs. τ de todas las bacterias estudiadas. Las bacterias que no tienen MB y las partículas de látex presentan $S_k \approx 0$ para todo τ . Las que presentan MB tienen $S_k \neq 0$ con cierta persistencia temporal, con diferentes grados de asimetría dentro de este intervalo.

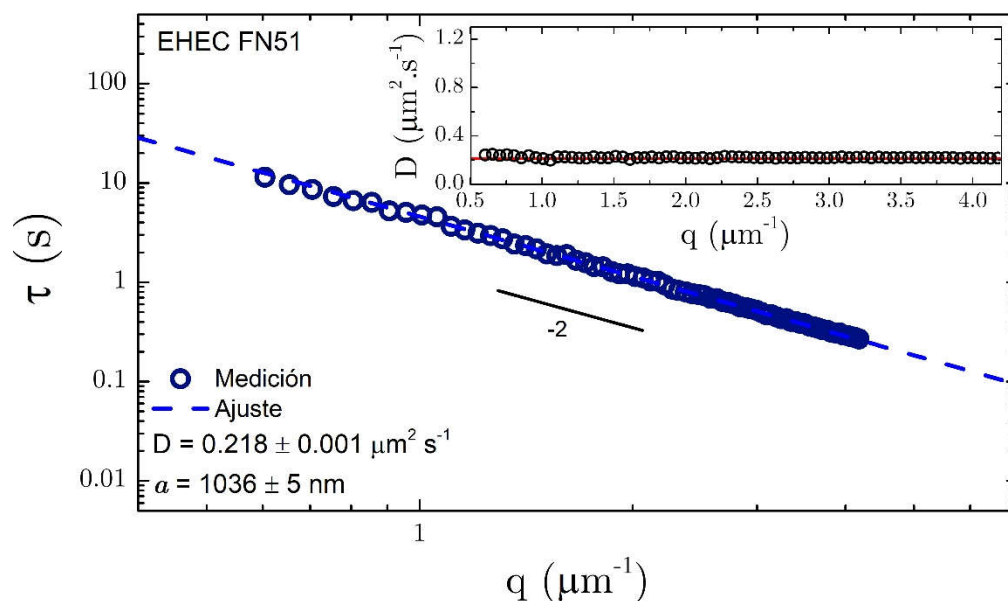


Fig. 6.7.3 τ vs q del análisis de las NISF's de *EHEC FN51*. En el recuadro el coeficiente de difusión D como función de q , donde la línea indica su valor promedio.

Para determinar si la falta de movimiento de *EHEC FN51* se debía a que ésta no expresaba los genes para la formación del flagelo o bien, que si los expresaba y se ensamblaba el flagelo pero este no era funcional, se realizaron experimentos de inmunodetección del flagelo en las dos cepas de *EHEC* utilizadas: *FN51* y *FN253* (descritos en el Apéndice B). El resultado fue que *EHEC FN51* no es capaz de formar los flagelos, a diferencia de *EHEC FN253* en la cual si se detectaron los flagelos con anticuerpos específicos contra el antígeno flagelar H7.

Todas las bacterias estudiadas muestran una morfología aproximada de esfero-cilindros, como se observa en la Fig. 6.6.2. Sin embargo, solo se puede estimar un radio hidrodinámico, a , con fines comparativos. Este radio se debe entender como el radio de una esfera equivalente, en el sentido de que dispersa luz en la misma proporción que la bacteria. Para el caso de *EHEC FN51* tenemos $a = 1036 \pm 5 \text{ nm}$.

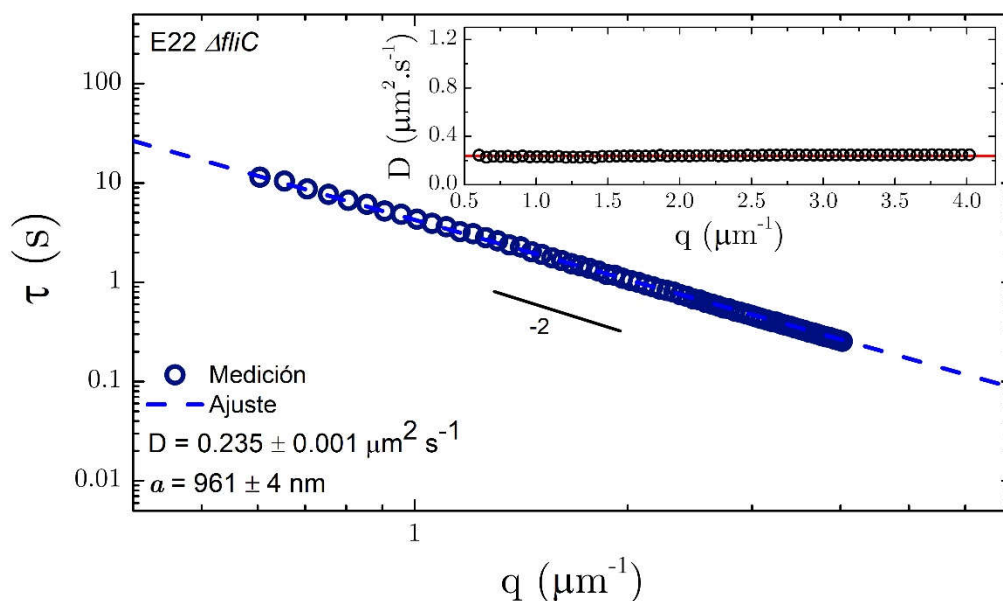


Fig. 6.7.4 τ vs. q del análisis de las NISF's de *E22ΔfliC*. En el recuadro el coeficiente de difusión D como función de q , donde la línea indica su valor promedio.

6.7.3 EPEC *E22wt* y *E22ΔfliC*

La Fig. 6.7.4 muestra los resultados obtenidos para *E22ΔfliC*. La fracción de bacterias en nado es $\alpha \approx 0$, indicando que la muestra está compuesta por bacterias en MD. Además, en la figura Fig. 6.6.3 se puede ver que esta bacteria no presenta un halo de crecimiento, corroborando así el resultado de DLS. En el recuadro se presenta D en función de q , donde la línea roja es su valor promedio, $D = 0.235 \pm 0.001 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. El radio hidrodinámico correspondiente es $a = 961 \pm 4 \text{ nm}$. Los resultados del análisis de TRS (q_r) se muestran en la Fig. 6.7.2 como rombos, de donde se obtiene que $S_k \approx 0$ para todo τ . Ahora, *E22wt* posee MB tal y como lo demuestra el valor del parámetro $\alpha = 0.9 \pm 0.011$, obtenido del modelo de ajuste. Es decir, el 90% de las bacterias en la muestra tienen la capacidad de nadar y el 10% de ellas no.

Entonces, las NISF's presentarán dos caídas, cada una con un tiempo característico (ver sección 6.5). En la Fig. 6.7.5 se muestran los resultados de este análisis. De la parte difusiva (círculos) se estima $D = 0.439 \pm 0.002 \mu m^2 \cdot s^{-1}$, de donde $a = 514 \pm 3 nm$. De la parte balística (cuadros) tenemos que la velocidad promedio de nado de las bacterias es $\bar{v} = 9.70 \pm 0.20 \mu m \cdot s^{-1}$. La velocidad se puede estimar sin ambigüedad hasta cierto valor q^* , el cual depende del tamaño (diámetro hidrodinámico) de la bacteria (ver sección 6.4). Más adelante se detalla como estimar q^* . En la Fig. 6.7.6 se presenta un resumen de los parámetros D , v y α , como función de q , extraídos del análisis descrito arriba.

Al calcular TRS (q_r), círculos en la Fig. 6.7.2, vemos que, a diferencia de las que se encuentran en MD, S_k presenta tendencia decreciente hasta decaer a $S_k \approx 0$. El valor de S_k en este vector de dispersión y para el tiempo de retardo mínimo accesible ($0.00914 = 1/(\text{FR de la cámara}, 109.42)$) es $\hat{S}_k = S_k(q = 0.9572, \tau_{min}) = 20.3$. En la subsección 6.7.6 se realiza un estudio detallado con la técnica de análisis TRS y en la 6.7.7 se ahonda sobre la importancia de \hat{S}_k .

6.7.3.1 Radio Hidrodinámico en una Mezcla con una Fracción α de Nadadores y $(1 - \alpha)$ de no Nadadores

Recordemos que *EPEC E22AflC* es una mutante de *EPEC E22wt* que no expresa el flagelo y, por lo tanto, no nada. Observamos que estas bacterias son idénticas en forma y tamaño, como lo demuestran los resultados de microscopía (ver sección 6.6.2). Sin embargo, los radios hidrodinámicos estimados del análisis de las NISF's para cada bacteria producen resultados distintos. Esto se debe a que el movimiento de las bacterias

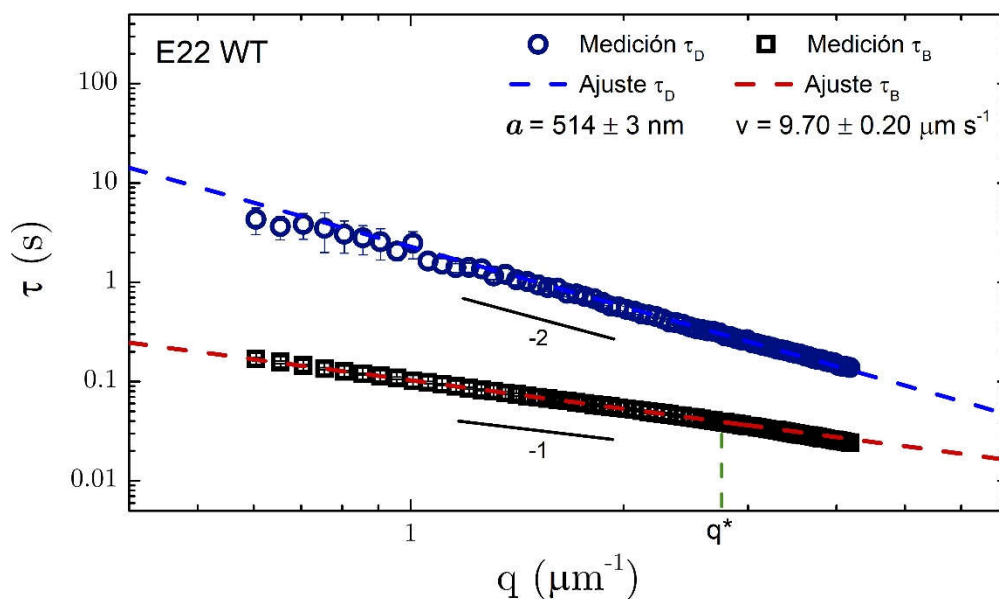


Fig. 6.7.5 τ vs q del análisis de las NISF's de *E22wt*. En círculos los tiempos difusivos y en cuadros los balísticos. En línea discontinua los ajustes lineales sobre cada uno de los tiempos, con pendiente ≈ -2 para el MD y, ≈ -1 para el MB. El ajuste sobre los tiempos balísticos se lleva a cabo hasta un q^* . En la leyenda el estimado del radio hidrodinámico y la velocidad promedio.

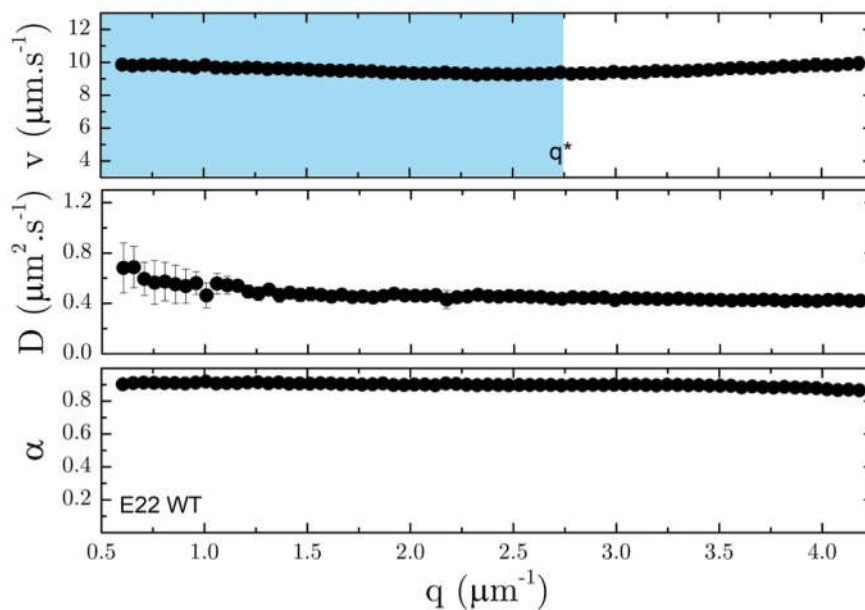


Fig. 6.7.6 Parámetros extraídos del modelo de ajuste para *E22wt*. q^* representa el vector de dispersión máximo accesible para estimar v .

en nado incrementa la difusión de las no nadadoras [1], lo que nos lleva a radios hidrodinámicos subestimados. El aumento en la difusión de las bacterias en MD tiene dependencia lineal con la fracción α de las que se encuentran en MB [1]. Dado que tenemos el coeficiente de difusión de las bacterias en MD puro, *EPEC E22 Δ fliC*, es posible estimar el factor por el cual el radio hidrodinámico de las bacterias en MD en la muestra de *EPEC E22wt* se encuentra subestimado, obteniendo $f = 1.87 = D_{E22wt}/D_{E22\Delta fliC}$. Aplicando este factor obtenemos $\tilde{a} = f * a = 960 \pm 3 \text{ nm}$, de donde podemos recuperar el radio de las bacterias en MD de la muestra *EPEC E22wt*. Ya que el factor f solo depende de α , este será utilizado para escalar los radios hidrodinámicos de todas las familias de bacterias estudiadas, que presentan MB, dado que α es similar en todas ellas.

6.7.3.2 Vector de Dispersión Máximo, q^*

Al estudiar con más detenimiento el comportamiento de la velocidad como función del vector q , observamos (Fig. 6.7.7) que para *E22wt* la velocidad presenta dos regiones de comportamiento lineal con pendientes distintas y una pequeña zona intermedia de transición. Se puede identificar el valor del vector de dispersión para el cual sucede el cambio en la pendiente como $q^* = 2.75$. Este valor define dos intervalos dentro del rango de q 's accesibles, $q \leq q^*$ y $q > q^*$. El intervalo $q \leq q^*$ es donde $l = 2\pi/q$ es lo suficientemente grande como para evitar que otros movimientos afecten la caída de la NISF (ver sección 6.1). Al calcular $l^* = 2\pi/q^* = 2.17 \mu\text{m}$, lo que nos define la longitud más pequeña utilizada para promediar las velocidades. Al comparar el valor de l^* con el del diámetro hidrodinámico de la bacteria, $d_H = 2\tilde{a} = 1.92 \mu\text{m}$, vemos que efectivamente $l^* > d_H$. En este intervalo se hace el ajuste lineal sobre los tiempos balísticos

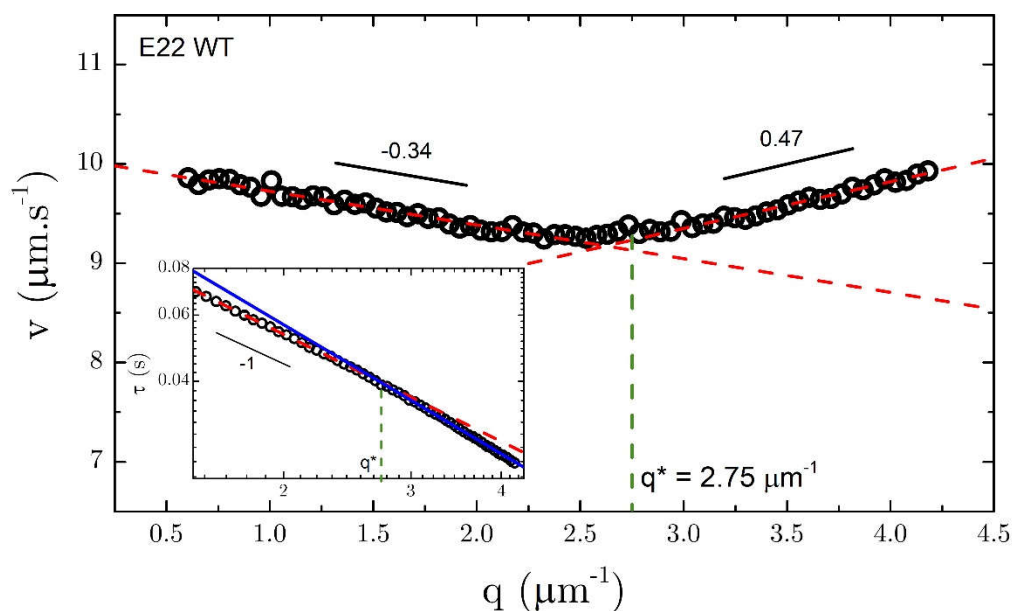


Fig. 6.7.7 v vs. q de $E22wt$. La velocidad presenta dos regiones de tendencia lineal con pendientes distintas. q^* representa el vector de dispersión donde sucede el cambio en la pendiente. Recuadro: acercamiento en los tiempos balísticos mostrados en la Fig. 6.7.5 alrededor de q^* y su ajuste lineal para $q \leq q^*$ (línea discontinua). La línea continua resulta del ajuste a los datos para $q > q^*$ y es una referencia para ver el grado de desviación en la escala.

(con acuerdo excelente entre datos y ajuste), para estimar la velocidad promedio de las bacterias, tal y como se muestra en la Fig. 6.7.5. El comportamiento de la velocidad dentro de este intervalo está relacionado con el estado de agitación de las bacterias [1]. En la sección 6.7.7 se discute sobre este hecho.

En el intervalo $q > q^*$ se pierde la escala de los tiempos balísticos, como se muestra en el recuadro en la Fig. 6.7.7, indicando que otros procesos, además del MB, afectan la caída de la NISF dentro de este intervalo. Como resultado, las velocidades estimadas presentan una tendencia lineal creciente, con una pendiente absoluta mayor que la definida por las velocidades en el intervalo $q \leq q^*$. Sobre la naturaleza de tales procesos

	Velocidad v ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	Radio hidrodinámico \tilde{a} (μm)	q máximo q^* (μm^{-1})	\hat{S}_k
$\ E22wt \ $	9.70 ± 0.20	960 ± 3	2.75	20.3

T. 6.7.1 Parámetros de caracterización para *EPEC E22wt*, obtenidos a partir de ajustar un modelo a las NISF's y del análisis de TRS (q_r).

solo se puede decir que estas fluctuaciones ocurren dentro de las bacterias, dadas las escalas l pequeñas medidas. El estudio y entendimiento de estos procesos quedan fuera del alcance de esta tesis. Sin embargo, los consideramos una buena línea de investigación futura, como una extensión del trabajo aquí realizado. En tabla 6.7.1 presentamos un resumen de los parámetros de caracterización para *EPEC E22wt*. Estos son utilizados como criterio de comparación para diferenciar entre bacterias.

Todo lo dicho anteriormente sobre la interpretación de resultados para EPEC E22wt se aplica para Salmonella typhimurium y EHEC FN253.

6.7.4 *Salmonella typhimurium*

En tabla 6.7.2 se presenta un resumen de los parámetros de caracterización de *Salmonella typhimurium*. Estos se obtienen de acuerdo con lo dicho en la sección 7.3.

En la Fig. 6.7.8 se muestran los resultados del análisis de los tiempos característicos de *Salmonella typhi*. De la parte difusiva (círculos) se estima $a = 599 \pm 11 \text{ nm}$. De la parte balística (cuadros) tenemos que la velocidad promedio de nado de las bacterias es $\bar{v} = 8.34 \pm 0.09 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. En la Fig. 6.7.9 se presenta un resumen de los parámetros D , v y

α , como función de q , extraídos del análisis descrito arriba. En la Fig. 6.7.10 se presenta la velocidad como función del vector q para *Salmonella typhi*, la velocidad presenta dos regiones de comportamiento lineal con pendientes distintas y una pequeña zona intermedia de transición.

	Velocidad v ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	Radio hidrodinámico \tilde{a} (nm)	q máximo q^* (μm^{-1})	\hat{S}_k
<i>Salmonella typhi.</i>	8.34 ± 0.09	1120 ± 3	2.58	11.0

T. 6.7.2 Parámetros de caracterización para *Salmonella typhi*, obtenidos a partir de ajustar un modelo a las NISF's y del análisis de TRS (q_r).

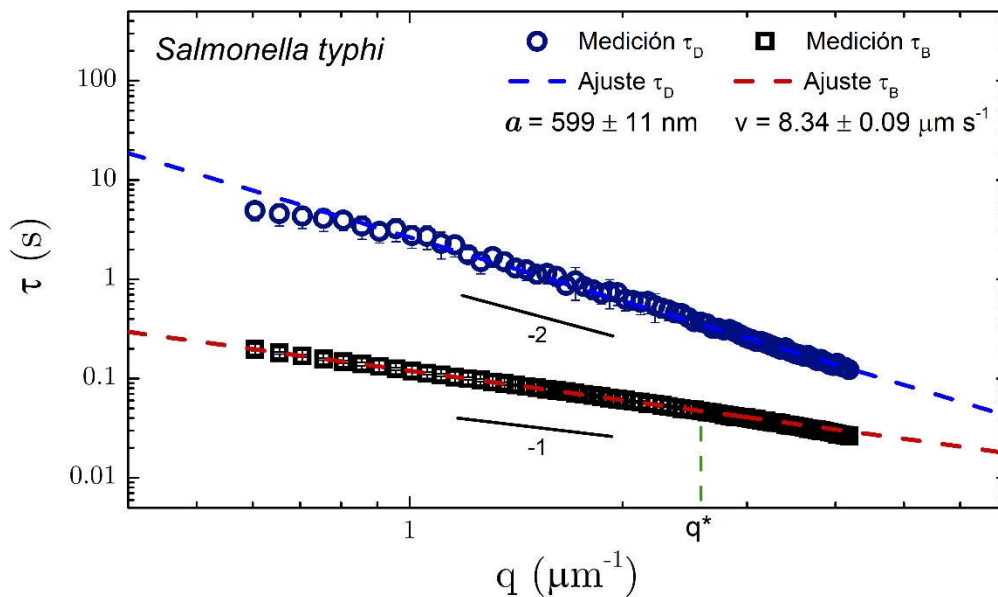


Fig. 6.7.8 τ vs. q del análisis de las NISF's de *Salmonella typhi*. En círculos los tiempos difusivos y en cuadros los balísticos. En línea discontinua los ajustes lineales sobre cada uno de los tiempos, con pendiente ≈ -2 para el MD y ≈ -1 para el MB. El ajuste sobre los tiempos balísticos se hace hasta q^* . En la leyenda el estimado del radio hidrodinámico y la velocidad promedio correspondientes.

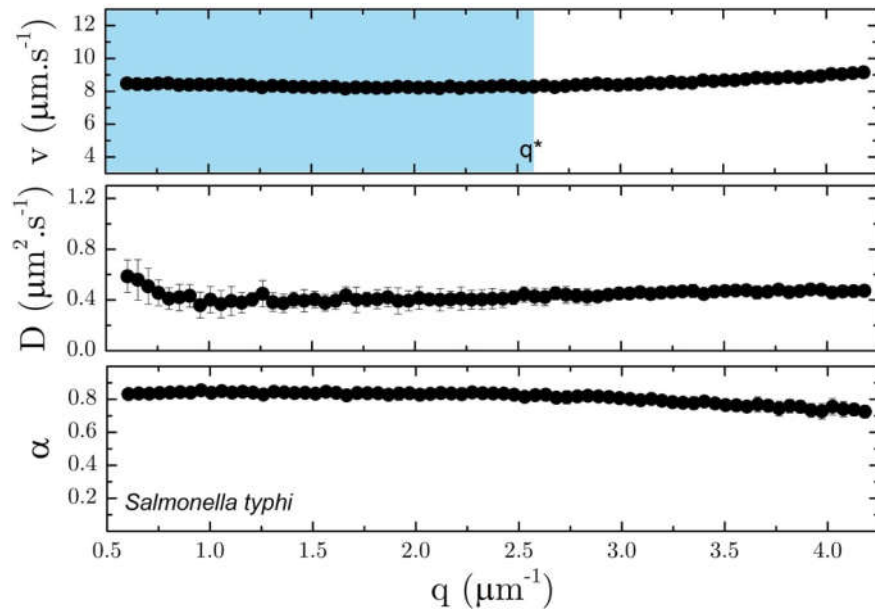


Fig. 6.7.9 Parámetros extraídos del modelo de ajuste para *Salmonella typhi*. q^* representa el vector de dispersión máximo accesible para estimar v .

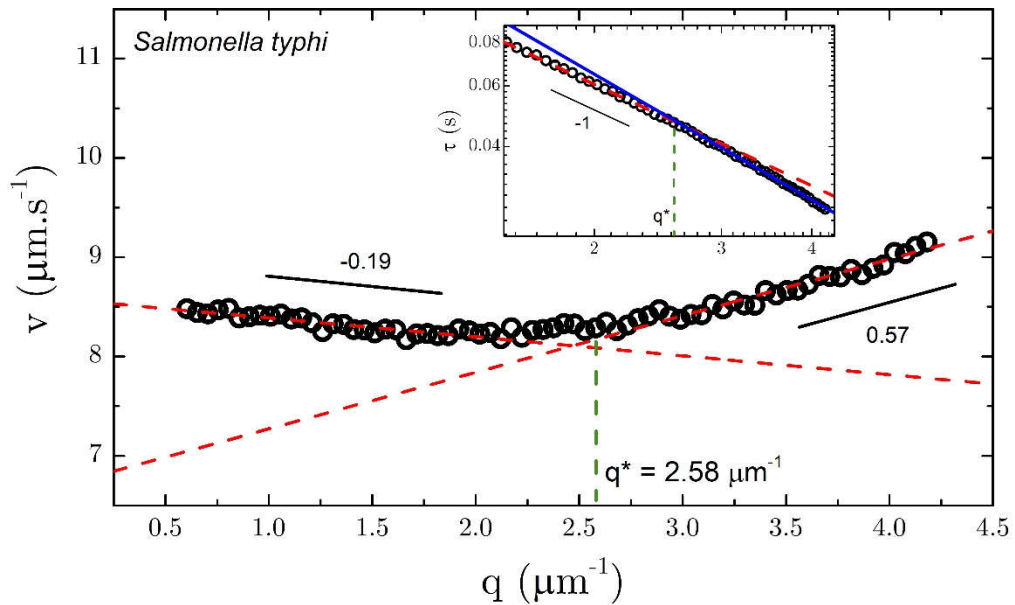


Fig. 6.7.10 v vs. q de *S. typhi*. La velocidad presenta dos regiones de tendencia lineal con pendientes distintas. q^* representa el vector de dispersión donde sucede el cambio en la pendiente. Recuadro: acercamiento en los tiempos balísticos mostrados en la Fig. 6.7.8 alrededor de q^* y su ajuste lineal para $q \leq q^*$ (línea discontinua). La línea continua resulta del ajuste a los datos para $q > q^*$ y es una referencia para ver el grado de desviación en la escala.

6.7.5 EHEC FN253

En la tabla 6.7.3 se resumen los parámetros de caracterización de *EHEC FN253*. Estos se obtienen de acuerdo con lo dicho en la sección 7.3.

	Velocidad v ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	Radio hidrodinámico \tilde{a} (nm)	q máximo q^* (μm^{-1})	\hat{S}_k
<i>EHEC FN253</i>	7.89 ± 0.20	1317 ± 6	1.97	58.4

T. 6.7.3 Parámetros de caracterización para *EHEC FN253*, obtenidos a partir de ajustar un modelo a las NISF's y del análisis de TRS (q_r).

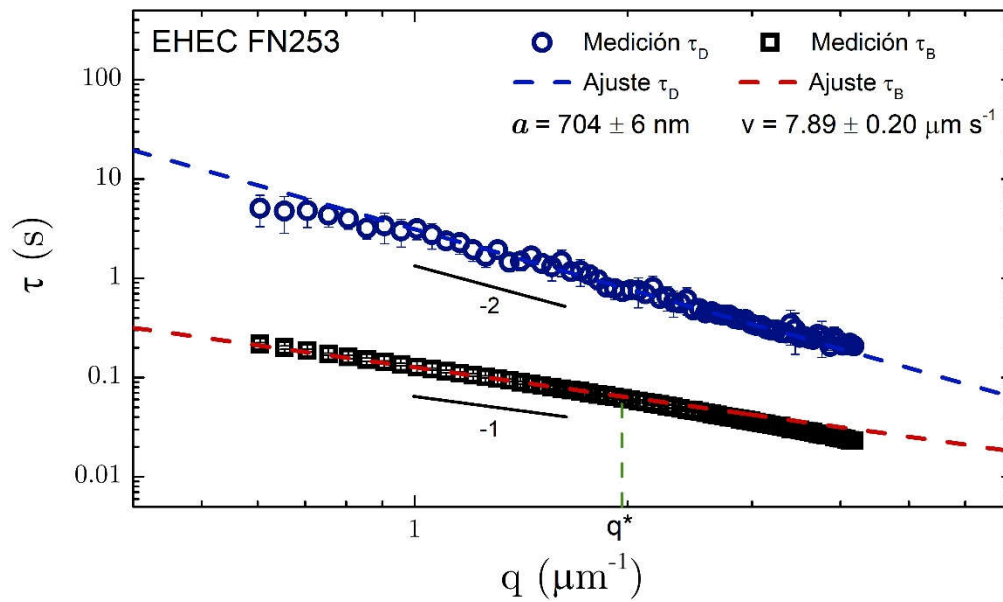


Fig. 6.7.11 τ vs. q del análisis de las NISF's de *EHEC FN253*. En círculos los tiempos difusivos y en cuadros los balísticos. En línea discontinua los ajustes lineales sobre cada uno de los tiempos, con pendiente ≈ -2 para el MD y ≈ -1 para el MB. El ajuste sobre los tiempos balísticos se hace hasta q^* . En la leyenda el estimado del radio hidrodinámico y la velocidad promedio.

En la Fig. 6.7.11 se muestran los resultados del análisis de los tiempos característicos de *EHEC FN253*. De la parte difusiva (círculos) se estima $a = 704 \pm 6 \text{ nm}$. De la parte balística (cuadros) tenemos que la velocidad promedio de nado de las bacterias es $\bar{v} = 7.89 \pm 0.20 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$.

En Fig. 6.7.12 se presenta un resumen de los parámetros D , v y α , como función de q , extraídos del análisis descrito arriba. En la Fig. 6.7.13 se presenta la velocidad como función del vector q para *EHEC FN253*, la velocidad presenta dos regiones de comportamiento lineal con pendientes distintas y una pequeña zona intermedia de transición.

6.7.6 Tiempo Promedio de Agitación, τ^*

En esta parte se realizó el análisis TRS para 5 valores del vector de dispersión, $q = 0.755, 0.957, 2.020, 2.990$ y $4.024 \mu\text{m}^{-1}$, y los resultados obtenidos se muestran en Fig. 6.7.14. Vemos que S_k presenta la misma tendencia decreciente descrita anteriormente y, además, la amplitud de las curvas decrece con el aumento del valor de q . Esto es atribuido a la reducción en la escala de medición l , lo que provoca que otros procesos contribuyan a la señal de dispersión. Estos procesos son más significativos entre más pequeño sea l con respecto d_H , haciendo que S_k decaiga incluso a valores negativos, cada vez mayores conforme l decrece, o mientras q aumenta. Sin embargo, observamos que sin importar el comportamiento de S_k para cada bacteria, todas las curvas convergen a un valor del tiempo de retardo τ^* a partir del cual $S_k \approx 0$. En la tabla 6.7.4 presentamos el valor de τ^* para cada bacteria.

Ahora, recordemos que el análisis de TRS permite estimar dinámica heterogénea provocada por cambios abruptos en el estado de movimiento (sección 6.5.2). Las bacterias en

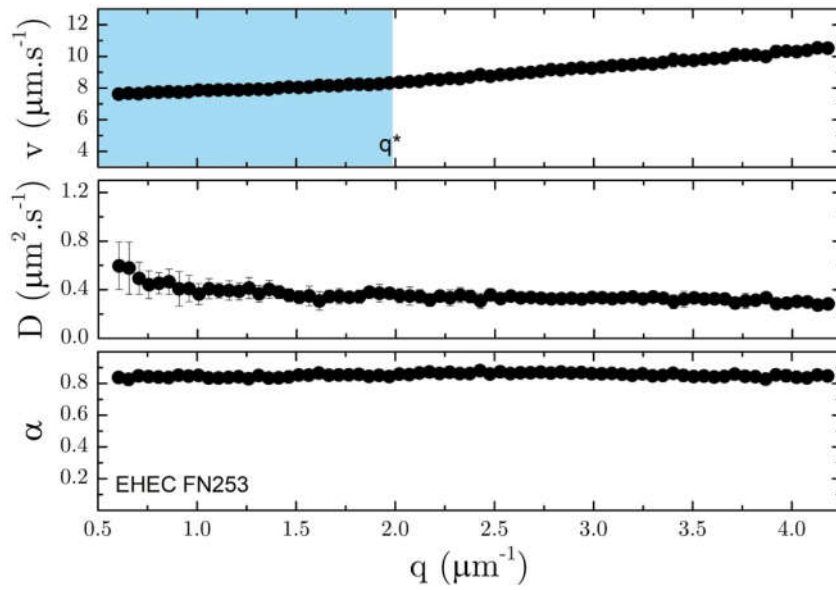


Fig. 6.7.12 Parámetros extraídos del modelo de ajuste para *EHEC FN253*. q^* representa el vector de dispersión máximo accesible para estimar v .

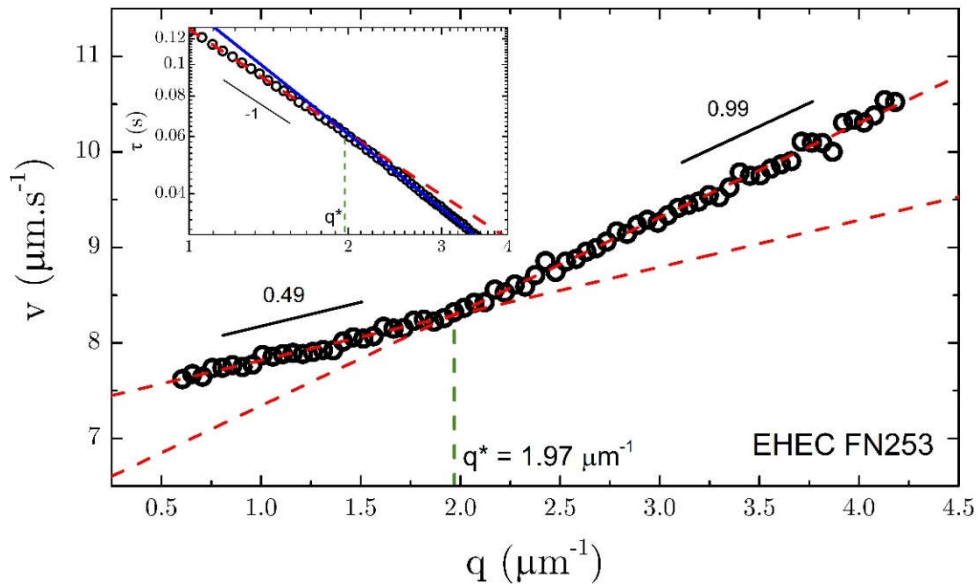


Fig. 6.7.13 v vs. q de *EHEC FN253*. La velocidad presenta dos regiones de tendencia lineal con pendientes distintas. q^* representa el vector de dispersión donde sucede el cambio en la pendiente. Recuadro: acercamiento en los tiempos balísticos mostrados en la Fig. 6.7.11 alrededor de q^* y, su ajuste lineal para $q \leq q^*$ (línea discontinua). La línea continua resulta del ajuste a los datos para $q > q^*$ y es una referencia para ver el grado de desviación en la escala.

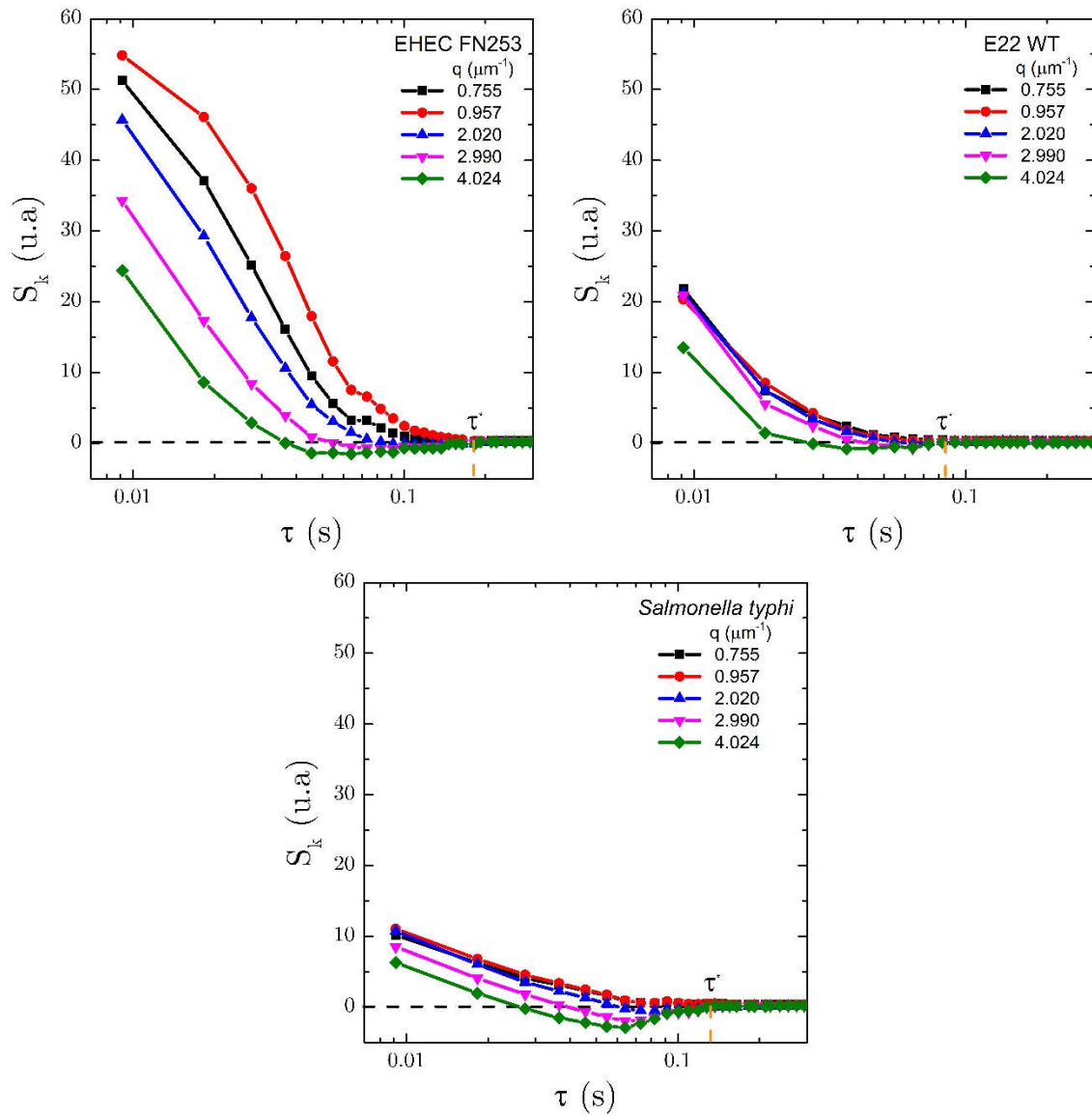


Fig. 6.7.14 Resultados del análisis de TRS para diferentes q 's, de las bacterias *EHEC FN253*, *EPEC E22wt* y *Salmonella typhi*. para $q = 0.755, 0.957, 2.020, 2.990$ y $4.024 \mu\text{m}^{-1}$. τ^* es el tiempo promedio de agitación de las bacterias.

	<i>EHEC FN253</i>	<i>EPEC E22wt</i>	<i>S. typhi</i> .
τ^* (s)	0.13	0.09	0.18

T. 6.7.4 Tiempo promedio de agitación de las bacterias, τ^* .

solución presentan tres estados de movimiento: nado, difusión y agitación. El nado y la difusión son movimientos con dinámica homogénea, $S_k \approx 0$. Pero, la agitación es un fenómeno repentino e instantáneo que rompe de forma abrupta con el movimiento de nado de las bacterias (ver sección 6.2).

Además, la agitación misma es un estado de movimiento caótico que generará que la luz dispersada contenga una componente heterogénea con cierta persistencia temporal, la cual puede ser relacionada con el tiempo promedio de agitación.

Entonces, podemos concluir que el fenómeno anómalo que provoca que las trazas en análisis de TRS presenten un grado de asimetría, $S_k(q) \neq 0$, con una persistencia temporal dada por τ^ , se relaciona con la agitación de las bacterias, y que τ^* representa el tiempo promedio que éstas permanecen en dicho estado.* Los tiempos promedio de agitación que aquí se estimaron concuerdan muy bien con lo reportado en la literatura para E. coli [2].

6.7.7 Frecuencia de Agitación

En la sección anterior se estimó el tiempo promedio que las bacterias permanecen en estado de agitación, ahora veremos que es posible relacionar uno de los parámetros ya calculado, \hat{S}_k , con la frecuencia con la que las bacterias entran en dicho estado. En la Fig. 6.7.15 mostramos las velocidades en el intervalo de vectores de dispersión $q \leq q^*$, de nuestros sistemas. Vemos que dos de ellas, *Salmonella typhi*. y *EPEC E22wt*, presentan una tendencia decreciente de las velocidades con q , lo que implica que la frecuencia con la que entran en agitación es baja. Por otro lado, la tendencia en q de las velocidades

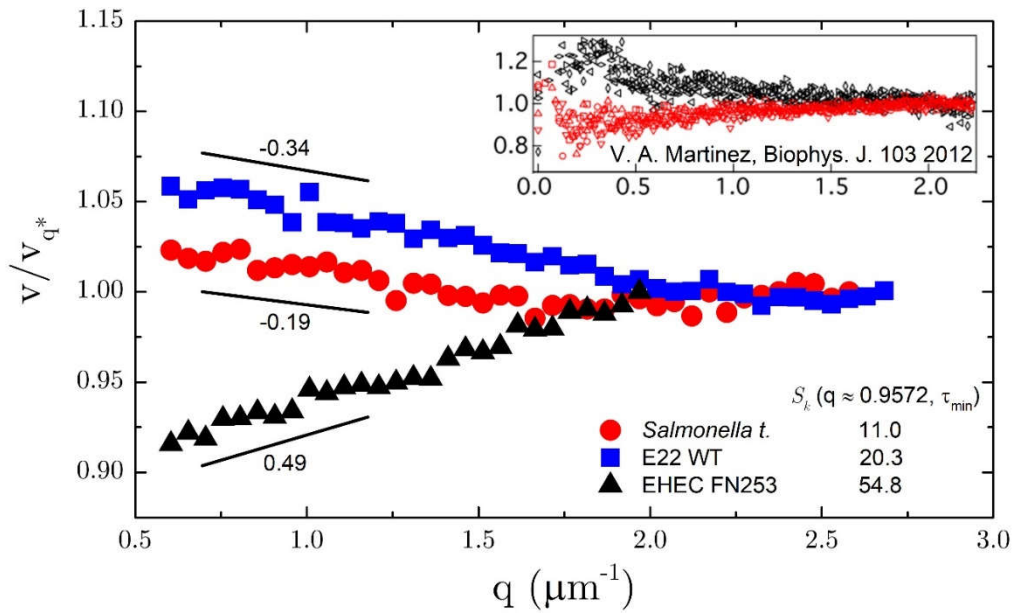


Fig. 6.7.15 Velocidad promedio de las bacterias con MB en el rango de vectores de dispersión $q \leq q^*$. En la leyenda se presenta el grado de asimetría \hat{S}_k . Recuadro: comportamiento de las velocidades de acuerdo con la frecuencia de agitación de las bacterias, tomadas de la Ref. [2]. Símbolos rojos, alta frecuencia de agitación. Símbolos negros, baja frecuencia de agitación.

de *EHEC FN253* es creciente, lo que nos dice que es una bacteria con frecuencia de agitación alta. Para efectos de comparación, en el recuadro de esta figura se muestran datos obtenidos por V. A. Martinez, et al., presentados en la Ref. [2], en donde realizaron estudios de DLS con la técnica DDM en dos tipos de bacterias *E. coli*, cuya diferencia reside en la frecuencia con la que cada una entra en agitación. Los experimentos los realizan en la región de vectores de dispersión pequeños (l grandes) para evitar que procesos dinámicos internos de las bacterias afecten la caída de las NISF's. Para la bacteria que presentaba una frecuencia de agitación menor, lo que implica intervalos de nado largos, encontraron que las velocidades presentaban una tendencia decreciente (pendiente negativa) al graficarlas en función de q , como muestran los símbolos negros en el recuadro de la Fig. 6.7.15. Por otro lado, la bacteria con intervalos de nado más

cortos y, por lo tanto, con una frecuencia de agitación mayor, presentan una tendencia creciente (pendiente positiva) de las velocidades en función de q , como muestran los símbolos rojos en el recuadro de la Fig. 6.7.15.

Para cuantificar de mejor manera la frecuencia de agitación, retomemos la esencia del análisis de TRS. Sabemos que este método de análisis cuantifica dinámica heterogénea mediante el cálculo del grado de estructuración $s_I(\mathbf{q}, t_w, \tau)$, estimando la asimetría en la distribución de las trazas, S_k . También sabemos, de la sección anterior, que el estado de movimiento que produce tales asimetrías es la agitación de las bacterias. Entonces, es de esperar que a mayor frecuencia de agitación se observe una mayor asimetría en la traza. Esto se puede corroborar comparando S_k para un vector de dispersión y un tiempo de retardo dados $\hat{S}_k = S_k(q = 0.9572, \tau_{min})$, con la tendencia en las velocidades, de forma concreta, con la pendiente de estas m . En la tabla 6.7.5 se presentan los valores de \hat{S}_k y m para cada bacteria. Vemos que las bacterias catalogadas anteriormente como de baja frecuencia de agitación (pendiente negativa), *EPEC E22wt* y *Salmonella typhi.*, tienen valores de \hat{S}_k menores que la catalogada como de alta frecuencia de agitación, *EHEC FN253*. Además, de entre las dos con baja frecuencia de agitación, la que tiene un menor grado de asimetría; *Salmonella typhi.*, es también la que posee una pendiente menor.

	<i>EHEC FN253</i>	<i>EPEC E22wt</i>	<i>S. typhi.</i>
\hat{S}_k	54.8	20.3	11.0
m	0.49	-0.34	-0.19

T. 6.7.5 Valores del grado de asimetría, \hat{S}_k , y de las pendientes, m , de las velocidades en función de q .

	<i>EHEC FN253</i>	<i>EPEC E22wt</i>	<i>S. typhi.</i>
v ($\mu m \cdot s^{-1}$)	7.89 ± 0.20	9.70 ± 0.20	8.34 ± 0.09
\tilde{a} (nm)	1317 ± 6	960 ± 3	1120 ± 3
q^* (μm^{-1})	1.97	2.75	2.58
\hat{S}_k	54.8	20.3	11.0
τ^* (s)	0.13	0.09	0.18

T. 6.7.6 Parámetros característicos de la dinámica de movimiento de bacterias con propulsión flagelar.

Entonces, como se esperaba, existe una clara relación entre el grado de asimetría \hat{S}_k y la pendiente de las velocidades m , lo cual nos indica que TRS permite estimar la frecuencia de agitación y asignarle un valor representativo a través del grado de asimetría \hat{S}_k .

6.7.8 Resumen de Resultados

De los experimentos de DLS realizados con la técnica HNFLS para 3 cepas bacterianas con propulsión flagelar (*EHEC FN253*, *EPEC E22wt*, *Salmonella typhi.*), analizados mediante: a) el ajuste de un modelo a las NISF's y, b) técnica TRS. Hemos identificado 5 parámetros característicos de la dinámica de movimiento de estos microorganismos. Los parámetros son: velocidad promedio de nado (v), radio hidrodinámico (\tilde{a}), vector de dispersión máximo accesible (q^*), grado de asimetría $S_k(q = 0.9572, \tau_{min})$, (\hat{S}_k), y tiempo promedio de agitación (τ^*). En la tabla 6.7.6 presentamos un resumen de nuestros resultados. Estos parámetros nos dan suficiente información para poder diferenciar

entre bacterias mediante experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS) en la configuración HNFLS.

Capítulo 7

CONCLUSIONES

El trabajo presentado en esta tesis representa un avance significativo en el desarrollo de técnicas experimentales no invasivas para el estudio de materiales suaves complejos y en la caracterización de microorganismos con propulsión flagelar mediante *Dispersión Dinámica de Luz* (DLS). Como parte del desarrollo de técnicas no invasivas para investigar sistemas suaves complejos, se implementó una nueva técnica experimental, 3DDLS-*Echo*. Para el estudio y caracterización de patógenos en suspensión acuosa, se aplicó una técnica experimental, HNFLS, y un método de análisis, TRS, nunca utilizados para el estudio de este tipo de sistemas.

A continuación, se resumen los logros alcanzados en cada uno de estos tópicos.

Correlación temporal de fotones en medios compuestos.

En este trabajo se describe cómo implementar la técnica *Echo*-DLS en un equipo 3DDLS convencional, alcanzando tal estabilidad y precisión que las alturas de los ecos corresponden directamente con la función de correlación cruzada normalizada de las intensidades, ICF. La técnica 3DDLS-*Echo* es capaz de promediar un gran número de configuraciones del sistema, permitiendo el cálculo de la ICF de sistemas arrestados o

con tiempos de relajación lentos en decenas de segundos. Al igual que en experimentos convencionales de 3DDLS, las alturas de los ecos se ven afectadas por el grado de turbidez de la muestra, pero la dinámica se mantiene inalterada. Demostramos que la altura del eco cero corresponde al valor del factor de coherencia de la muestra, β_{12} , y que éste puede ser fácil y rápidamente estimado (decenas de segundos) en mediciones 3DDLS convencionales en modo multitau, rotando a frecuencias altas. Por lo tanto, la turbidez máxima que puede ser estudiada con la técnica 3DDLS-*Echo* es la misma que limita a la técnica 3DDLS convencional.

Además, gracias a la estabilidad alcanzada en nuestra configuración, es posible relacionar directamente la altura de los ecos con la ICF sin necesidad de un factor de escala *ad-hoc*. Esto representa una gran ventaja en el diseño de experimentos de sistemas con relajación lenta o con evolución temporal donde la altura del *plateau* cambie en función de la temperatura, pH, ángulo de dispersión, etc., reduciendo considerablemente el tiempo de medición sin sacrificar la precisión de los resultados. Con 3DDLS-*Echo* es posible marcar sistemas con muy pocas partículas trazadoras ($\varphi = 1 \times 10^{-4}$) a diferencia de técnicas como DWS-*Echo*, donde la luz debe ser dispersada muchas veces antes de ser detectada, lo que implica usar altas concentraciones de partículas como trazadoras y, con ello, el consumo de una cantidad considerable de recursos.

Finalmente, se mostró la utilidad de la técnica 3DDLS-*Echo* en tres sistemas:

a) Geles de poliacrilamida. Mostramos que las alturas de los *plateaus* son estimadas directamente de mediciones con la técnica 3DDLS-*Echo*. **b)** Soluciones coloidales concentradas cargadas. Con este sistema se generaliza la técnica 3DDLS-*Echo* para el

estudio de sistemas con dependencia angular. c) Microreología óptica pasiva. Con la técnica 3DDLS-*Echo* se accede a los tiempos largos de la NISF de un sistema con relajación lenta de interés industrial (gel fijador para cabello). Los módulos elástico y viscoso obtenidos a partir de la NISF presentan un muy buen acuerdo con los medidos con reología mecánica, demostrando así la precisión de nuestra técnica óptica.

En nuestro conocimiento, el trabajo aquí realizado representa la primera vez que se logra conectar las ideas detrás de 3DDLS con técnicas de *Echo*-DLS. Además, el grado de precisión alcanzado no ha sido logrado en ninguna otra implementación de la técnica *Echo*-DLS. Nuestros resultados abren la oportunidad de estudiar sistemas ergódicos y no ergódicos moderadamente turbios, como materiales viscoelásticos blandos, cristales coloidales, vidrios y geles.

Caracterización de patógenos mediante dispersión dinámica de luz.

HNFLS es una técnica experimental versátil para el estudio de las propiedades dinámicas de partículas en suspensión. Con los experimentos aquí realizados hemos demostrado que, en conjunto con los métodos de análisis implementados, HNFLS es una herramienta poderosa para la caracterización de la dinámica de nado tridimensional de microorganismos con propulsión flagelar. De los métodos de análisis utilizados en los experimentos de dispersión dinámica de luz, TRS es una propuesta novedosa que hemos utilizado para arrojar luz sobre el movimiento de agitación de las bacterias, con resultados más que satisfactorios.

De los experimentos y los métodos de análisis hemos determinamos cinco parámetros

característicos de la dinámica de movimiento de diferentes tipos de bacterias en con propulsión flagelar (*EHEC FN253*, *EPEC E22wt*, *Salmonella typhimurium*). Los parámetros son: velocidad promedio de nado (v), radio hidrodinámico (\tilde{a}), vector de dispersión máximo accesible (q^*), grado de asimetría $S_k(q = 0.9572, \tau_{min})$, \hat{S}_k , relacionado con la frecuencia de agitación y tiempo promedio de agitación (τ^*). La velocidad promedio, el vector de dispersión máximo y el radio hidrodinámico se obtuvieron al realizar el ajuste de un modelo sobre la NISF, mientras que el grado de asimetría y el tiempo promedio de agitación, son el resultado de aplicar el método de análisis TRS.

De los resultados obtenidos por el ajuste de un modelo sobre la NISF, demostramos que el vector de dispersión máximo accesible define el valor de q a partir del cual, la caída de la NISF se ve afectada por procesos dinámicos internos de la bacteria. Esta es la principal razón por la cual la velocidad promedio se estima para vectores de dispersión $q \leq q^*$. Cabe mencionar que no existe registro en la literatura de estudios sobre este tipo de procesos, por lo que, muy poco se puede decir sobre ellos. Sin embargo, dadas las escalas l probadas en nuestro arreglo experimental, podemos asegurar que estos procesos de decorrelación dinámica son provocados por la estructura interna de las bacterias. Se requiere de un mejor entendimiento de la fisiología de las bacterias para intentar entender la dinámica intrínseca y proponer modelos que expliquen nuestros resultados en esta región del rango de vectores de dispersión estudiados con la técnica HNFLS, $q > q^*$. Además, se demostró que es posible recuperar el radio hidrodinámico de las bacterias en mezclas con una proporción α de nadadores y una de $(1 - \alpha)$ de no nadadores.

Con la técnica de análisis TRS se determinaron un par de parámetros nunca estimados

en experimentos de dispersión dinámica de luz: tiempo promedio, τ^* , y frecuencia de agitación, \hat{S}_k , de las bacterias en suspensión. Este par de parámetros no son accesibles a través de solo estudiar la NISF, ya que la dinámica que poseen las bacterias con flagelos resulta ser heterogénea, tal y como lo demuestran nuestros análisis de TRS. A la frecuencia de agitación se le asigna un valor mediante el grado de asimetría \hat{S}_k , el cual demostramos está directamente relacionado con la frecuencia con la cual las bacterias entran en estado de agitación.

Consideramos que el conjunto de parámetros que hemos sido capaces de estimar, son de suma importancia en la caracterización de microorganismos móviles como las bacterias, aún más, que es posible diferenciar entre cepas de bacterias con propulsión flagelar de una forma rápida y a un bajo coste.

Apéndice A

OBTENCIÓN DE $B(q)$

El valor de $B(q)$ se determina para cada experimento a partir de un análisis del patrón de dispersión promedio del sistema en estudio. Dado que la configuración óptica no cambia, el valor de $B(q)$ es muy parecido entre diferentes experimentos. Las diferencias que existen en el valor de $B(q)$ de un experimento a otro son debidas, principalmente, al uso de diferentes celdas que contienen a las muestras, y de cómo éstas se colocan en el instrumento. En la Fig. A1 a) se muestra un patrón de dispersión promedio representativo de un experimento de HNFLS en *Salmonella typhimurium*. El vector de dispersión máximo dentro de la zona iluminada es $4.5 \mu m^{-1}$. Este valor se define por la configuración óptica del instrumento (ver sección 6 · 4).

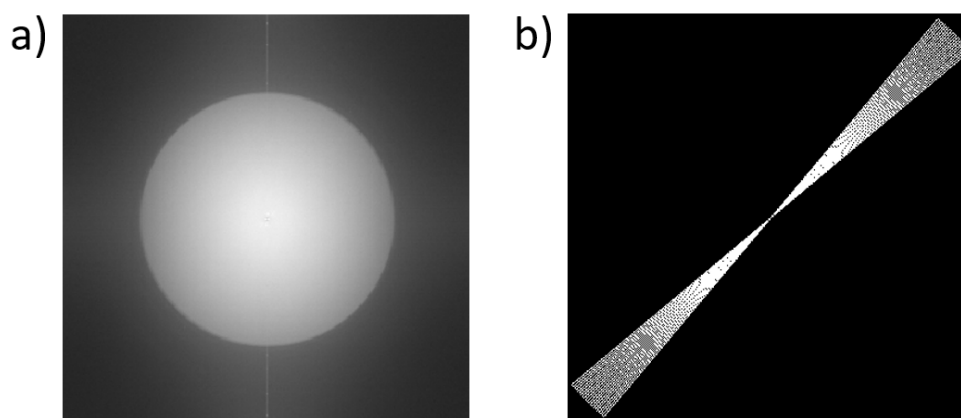


Fig. A1 a) patrón de dispersión promedio *Salmonella typhimurium*. b) región promediada para obtener el perfil de intensidades.

Después de la región iluminada se observa una zona de penumbra que se desvanece hasta que, cerca de las esquinas, se aprecian las regiones más oscuras de la imagen. Es en esta región donde podemos estimar el ruido de fondo sobre el cual la señal de dispersión es detectada, es decir, $B(q)$. Para esto se promedian las intensidades en una región del patrón tal que sea posible estimar el valor de $B(q)$. Los pixeles utilizados en dicho promedio se pueden observar en la máscara presentada en Fig. A1 b). El promedio se realiza sobre una rebanada de 10° . El perfil de intensidades obtenido de esta forma se muestra en la Fig. A2. En esta figura vemos claramente como el perfil decae hasta llegar a un *baseline* bien definido diferente de cero. El valor de este *baseline* corresponde con el nivel ruido presente en la medición, $B(q)$.

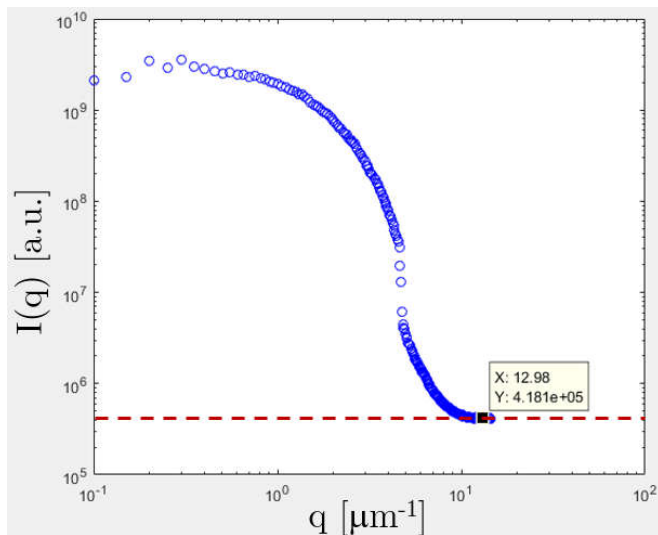


Fig. A2 Perfil de intensidades promediando sobre una rebanada de 10° de ancho del patrón de dispersión promedio de *Salmonella typhimurium*. Vemos que el perfil cae a un *baseline* el cual define el valor de $B(q)$.

Apéndice B

ENSAYOS DE EXPRESIÓN DE FLAGELOS EN *EHEC FN51* Y *EHEC FN253*

Para determinar si las bacterias expresaban el flagelo, las cepas de interés se crecieron como se describe en las cinéticas de crecimiento. Después de 4 *hrs* los cultivos se centrifugaron a 10,000 x g por 10 *min* a 4°C, se recuperaron los paquetes bacterianos y se resuspendieron en 0.5 *ml* de PBS frío. Las bacterias se lisaron por sonicación dos veces a 50% de amplitud por 30 *s* con un ultrasonicador VCX130PB (Sonics, Newton, CT), posteriormente se centrifugaron a 20,000 × g por 10 *min* a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron en congelación (-20°C) hasta su uso. Se cuantificó la concentración de proteínas en los sobrenadantes por el método de micro-Bradford (Bradford, 1976) y se cargaron cantidades iguales de proteínas de cada cepa en geles de SDS-PAGE. Las proteínas se separaron mediante electroforesis y posteriormente se analizó por Western-blot la expresión del flagelo.

Electroforesis en geles de poliacrilamida y transferencia electroforética.

Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato sódico (condiciones reductoras, SDS-PAGE). A cada muestra se le agregó regulador de muestra con 5% de β -mercaptoetanol (Sigma, San Luis, MO)

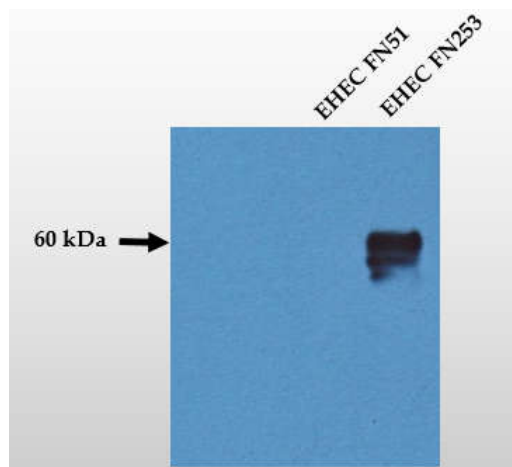


Fig. B1 Expresión del flagelo. La banda indica que *EHEC FN253* posee la proteína necesaria para formar flagelos. *EHEC FN51* carece de ella.

y se calentaron a ebullición durante 10 *min*. Las muestras se separaron a voltaje constante a 120 *V* durante 1.5 *hrs* o hasta que el regulador de corrida alcanzó la parte inferior de la cámara de electroforesis. Al terminar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF; Millipore, Darmstadt, Alemania) en una cámara de transferencia semiseca (Trans-Blot SD; BioRad, Hercules, CA) poniendo en contacto la membrana con el gel de poliacrilamida y se hizo pasar un voltaje constante de 20 *V* por 40 *min*. Las membranas se retiraron de la cámara y se procesaron para su análisis por Western-blot.

Western-blot

Para detectar la expresión del flagelo, la membrana de PVDF transferida se lavó con PBS-Tween 20 al 0.05% (PBST) (Hycl, Jalisco, México). Una vez lavada completamente la membrana, se bloqueó a temperatura ambiente con leche descremada al 5% en PBST durante 1 *h* o a 4°C toda la noche. Posteriormente se agregó el anticuerpo

primario anti-Antígeno flagelar H7 hecho en conejo (Donado por el Dr. Armando Navarro Ocaña, UNAM) diluido a una concentración de 1:60,000 en PBST y se incubó con la membrana a temperatura ambiente durante 1.5 *hrs*, finalizado este tiempo la membrana se lavó 3 veces por 10 *min* con PBST. En seguida se agregó el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP; Thermo Fisher, Waltham, MA) diluido a 1:25,000 en PBST y se incubó por un tiempo de 1 *h* a temperatura ambiente; al término de la incubación la membrana se lavó con PBST 6 veces por 10 *min*. La detección de la señal se hizo humedeciendo la membrana con un sustrato quimioluminiscente (Immobilon™, Millipore, Darmstadt, Alemania) por 1 *min* y poniendo en contacto la membrana tratada con placas radiográficas (Kodak, NY) durante el tiempo requerido; el revelado de las placas se llevó a cabo con revelador y fijador fotográfico (Kodak, NY). En Fig. B1 se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. Vemos que *EHEC FN253* presenta una banda clara en 60 *kDa* indicando la presencia de la proteína encargada de formar los flagelos, mientras que *EHEC FN51* carece de ella.

Bibliografía

- [1] P. Zakharov and F. Scheffold, *Advances in dynamic light scattering techniques*. In A. A. Kokhanovsky, Light scattering reviews 4. Springer, Germany (2009) 433-467.
- [2] A. Fernández-Nieves and A. M. Puertas, *Fluids, Colloids and Soft Materials: An Introduction to Soft Matter Physics*. Wiley, New York (2016).
- [3] L. G. Wilson, et. al., *Differential dynamic microscopy of bacterial motility*. Phys. Rev. Lett. **106** (2011) 018101.
- [4] V. A. Martinez, et al., *Differential dynamic microscopy: a high-throughput method characterizing the motility of microorganisms*. Biophys. J. **103** (2012) 1637-1647.
- [5] C. Haro-Pérez, et al., *Three dimensional cross-correlation dynamic light scattering by non-ergodic turbid media*. J. Chem. Phys. **134** (2011) 244902.
- [6] W. van Meegen and S. M. Underwood, *Glass transition in colloidal hard spheres: measurement and mode-coupling-theory analysis of the coherent intermediate scattering function*. Phys. Rev. E **49** (1994) 4206-4220.
- [7] C. Beck, et al., *The glass transition of charged and hard sphere silica colloids*. J. Chem. Phys. **111** (1999) 8209-8213.
- [8] K. N. Pham, et al., *Ensemble-averaging in dynamic light scattering by an echo technique*. Rev. Sci. Instrum. **75** (2004) 2419-2431.
- [9] P. Zakharov, et al., *Multispeckle diffusing-wave spectroscopy with a single-mode detection scheme*. Phys. Rev. E **73** (2006) 011413.
- [10] M. Medebach, et al., *Slow dynamics in dense oil-water emulsions studied using dynamic light scattering*. J. Phys.: Condens. Matter **21** (2009) 504111.

- [11] Hironori Yoshiyama and Teruko Nakazawa, *Unique mechanism of Helicobacter pylori for colonizing the gastric mucus*, *Microbes Infect.* **2** (2000) 55-60.
- [12] E. H. Harris, *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press, Oxford (2009).
- [13] H. C. Berg, *E. coli in Motion*. Springer, New York (2004).
- [14] A. A. Kokhanovsky, *Light Scattering Reviews 4*. Springer, Germany (2009).
- [15] B. J. Berne y R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*. Wiley, New York (1976).
- [16] M. Giglio, et al., *Space intensity correlation in the near-field of the scattered light: a direct measurement of the density correlation function $g(r)$* . *Phys. Rev. Lett.* **85** (2000) 1416.
- [17] F. Ferri, et al., *Heterodyne near-field scattering: A technique for complex fluids*. *Phys. Rev. E.* **70** (2004) 041405.
- [18] D. Brogioli, et al., *Heterodyne near-field scattering*. *Appl Phys Lett.* **81** (2002) 4109.
- [19] D. R. Bauer, et al., *Resonance Enhanced Depolarized Rayleigh-Scattering from Diphenylpolyenes*. *J. Chem. Phys.* **63** (1975) 588-589.
- [20] B. U. Felderhoff, *On the Propagation and Scattering of Light in Fluids*. *Physica* **76** (1974) 486-502.
- [21] W. Gelbart, *Depolarized light scattering by simple fluids*. *Adv. Chem. Phys.* **26** (1974) 1.
- [22] J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics*. Wiley, New York (1964).
- [23] L. D., Landau, E. M. and Lifshitz. *Electrodynamics of Continuous Media*. Oxford Pergamon Press, New York (1960).
- [24] P. Lindner, and Th. Zemb, editors, *Neutrons, X-Rays and Light, Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Elsevier (2002).

- [25] F. Giavazzi and R. Cerbino, *Digital Fourier Microscopy for Soft Matter Dynamics*. Journal of Optics, **16** (2014) 083001.
- [26] D. Magatti, et al., *Dynamic Heterodyne Near Field Scattering*. Appl. Phys. Lett. **92** (2008) 241101.
- [27] R. Cerbino and V. Trappe, *Differential Dynamic Microscopy: Probing Wave Vector Dependent Dynamics with a Microscope*. Phys. Rev. Lett. **100** (2008) 188102.
- [28] R. Cerbino, et al., *X-ray-scattering Information Obtained from Near-field speckle*. Nat. Phys. **4** (2008) 238–243.
- [29] F. Ferri, et al., *Kinetics of Colloidal Fractal Aggregation by Differential Dynamic Microscopy*. The Eur. Phys. J. Spec. Top. **199** (2011) 139–148.
- [30] S. Mazzoni, et al., *Sodi-colloid: A Combination of Static and Dynamic Light Scattering on Board the International Space Station*. Rev. Sci. Instrum. **84** (2013) 043704.
- [31] A. Jepson, et al., *Enhanced Diffusion of Nonswimmers in a Three-dimensional Bath of Motile Bacteria*. Phys. Rev. E **88** (2013) 041002.
- [32] C. Maggi, et al., *Motility Fractionation of Bacteria by Centrifugation*. Soft Matter **9** (2013) 10885-10890.
- [33] M. Reufer, et al., *Switching of swimming modes in magnetospirillum gryphiswaldense*. Biophys. J. **106** (2014) 37–46.
- [34] M. Reufer, et al., *Differential Dynamic Microscopy for Anisotropic Colloidal Dynamics*. Langmuir **28** (2012) 4618–4624.
- [35] B. Chu, *Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice*. Dover books on physics. Dover Publications, Incorporated, 2007.

- [36] L. Cipelletti and D. Weitz, *Ultralow-angle Dynamic Light Scattering with a Charge Coupled Device Camera Based Multispeckle, Multitau Correlator*. Rev. Sci. Instrum. **70** (1999) 3214–3221.
- [37] M. A. Escobedo-Sánchez, *Near field scattering: study of structural and dynamical properties of colloidal suspensions*. Master thesis, 2013, Cinvestav IPN, Mexico.
- [38] K. Schätzel, *Suppression of Multiple Scattering by Photon Cross-correlation Techniques*. J. Mod. Opt. **38** (1991) 1849–1865.
- [39] E. Overbeck and C. Sinn, *Three-dimensional dynamics light Scattering*. J. Mod. Opt. **46** (1999) 303-326.
- [40] C. Urban and P. Schurtenberger, *Characterization of Turbid Colloidal Suspensions Using Light Scattering Techniques Combined with Cross-correlation Methods*. J. of Colloid and Interface Sci. **207** (1998) 150-158.
- [41] L. B. Aberle, et al., *Effective Suppression of Multiply Scattered Light in Static and Dynamic Light Scattering*. Appl. Opt. **37** (1998) 6511-6524.
- [42] R. Pecora. *Dynamic light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*. Springer (1985).
- [43] C. Urban, Herbert utz verlag, ETH-Zürich (1999).
- [44] E. Overbeck, et al., *Approaching the limits of multiple scattering decorrelation: 3D light-scattering apparatus utilizing semiconductor lasers*. Prog. Colloid Polym. Sci. **104** (1997) 117-120.
- [45] J.-Z. Xue, et al., *Nonergodicity and light scattering from polymer gels*. Phys. Rev. A **46** (1992) 6550–6563.
- [46] K. Schätzel, *Accuracy of photon correlation measurements on nonergodic*

- samples. Appl. Opt.* **32** (1993) 3880–3885.
- [47] A. P. Y. Wong and P. Wiltzius, *Dynamic light scattering with a CCD camera. Rev. Sci. Instrum.* **64** (1993) 2547–2549.
- [48] S. Kirsch, et al., *Multispeckle autocorrelation spectroscopy and its application to the investigation of ultraslow dynamical processes. J. Chem. Phys.* **104** (1996) 1758-1761.
- [49] J. Müller and T. Palberg, *Probing slow fluctuations in nonergodic systems: Interleaved sampling technique. Prog. Colloid Polym. Sci.* **100** (1996) 121-124.
- [50] R. E. Mahaffy, et al., *Scanning Probe-Based Frequency-Dependent Microrheology of Polymer Gels and Biological Cells. Phys. Rev. Lett.* **85** (2000) 880-883.
- [51] S. Yamada, et al., *Mechanics of living cells measured by laser tracking Microrheology. Biophys. J.* **78** (2000) 1736-1747.
- [52] C. Wilhelm, et al., *Rotational magnetic endosome microrheology: viscoelastic architecture inside living cells. Phys. Rev. E* **67** (2003) 061908.
- [53] A. W. C. Lau, et al., *Microrheology, Stress Fluctuations, and Active Behavior of Living Cells. Phys. Rev. Lett.* **91** (2003) 198101.
- [54] T. G. Mason and D. A. Weitz, *Optical Measurements of Frequency-Dependent Linear Viscoelastic Moduli of Complex Fluids. Phys. Rev. Lett.* **74** (1995) 1250-1253.
- [55] A.R. Bausch, et al., *Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. Biophys. J.* **76** (1999) 573-579.
- [56] M. Tassieri, et al., *Microrheology with optical tweezers: data analysis. New J. of Phys.* **14** (2012) 115032.
- [57] T. G. Mason, et al., *Particle Tracking Microrheology of Complex Fluids. Phys. Rev. Lett.* **79** (1997) 3282-3285.

- [58] G. Ojeda, *Interacciones efectivas y transición vítrea en suspensiones coloidales estabilizadas electrostáticamente*. Tesis de doctorado, Física-Cinvestav, México, 2017.
- [59] R. Nossal, et al., *Use of laser scattering for quantitative determination of bacterial motility*. *Opt. Commun.* **4** (1971) 35-39.
- [60] Jana Schwarz-Linek, et al., *Escherichia coli as a model active colloid: A practical introduction*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **137** (2016) 2-16.
- [61] D. Germain, et al., *Differential dynamic microscopy to characterize Brownian motion and bacteria motility*. *American Journal of Physics* **84** (2016) 202-212.
- [62] J.P. Boon, et al., *Light-scattering spectrum due to the wiggling motions of bacteria*. *Biophys. J.* **14** (1974) 847-864.
- [63] L. Cipelletti, et al., *Time-resolved correlation: a new tool for studying temporally heterogeneous dynamics*. *J. Phys.: Condens. Matter* **15** (2003) S257-S262.
- [64] G.B. Stock, *The measurement of bacteria translation by photon correlation spectroscopy*. *Biophys. J.* **22** (1978) 79-96.
- [65] P.N. Pusey, and W. van Megen. *Detection of small polydispersities by photon correlation spectroscopy*. *J. Chem. Phys.* **80** (1984) 3513-3520.
- [66] R. Camguilhem and A. Milon, *Biotypes and O serogroups of Escherichia coli involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains*. *J. Clin. Microbiol.* **27** (1989) 743-747.
- [67] H. Salazar-Gonzalez, and F. Navarro-Garcia, *Intimate Adherence by Enteropathogenic Escherichia coli Modulates TLR5 Localization and Proinflammatory Host Response in Intestinal Epithelial Cells*. *Scandinavian Journal of Immunology* **73** (2011) 268-283.
- [68] L. W. Riley, et al., *Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli*

serotype. N. Engl. J. Med. **308** (1983) 681–685.

- [69] Viera-Pérez C., *Dispersión de luz a ángulos pequeños para la detección de bacterias patógenas modelo*. Tesis de maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., México, 2012.