



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**“IMPLEMENTACIÓN DE UN SENSOR ÓPTICO EN LA  
IDENTIFICACIÓN BACTERIANA”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

**Lucy Abigail Cruz Cruz**

DIRECTOR DE TESIS

**Dra. FABIOLA GABRIELA NIETO CABALLERO**

ASESOR DE TESIS

**Dra. ANA MARTA DE LOS ÁNGELES LOBO SÁNCHEZ**

ASESOR EXTERNO

**Dr. GODOFREDO GARCÍA SALGADO**

Puebla, Pue., diciembre 2019

## Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
<i>Staphylococcus aureus</i> . ....	9
<i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	11
Transformada de Fourier.....	15
<b>Materiales semiconductores</b> . ....	18
<b>Electroquímica</b> .....	20
<b>Silicio poroso (SP)</b> . ....	20
<b>Reflector de Bragg</b> .....	23
<b>Reflexión de la luz</b> . ....	27
<b>Índice de refracción en silicio poroso</b> . ....	28
<b>MARCO DE REFERENCIA</b> . ....	29
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	30
<b>JUSTIFICACIÓN</b> . ....	32
<b>OBJETIVO GENERAL</b> . ....	33
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> . ....	33
<b>DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	33
<b>Obtención de las bacterias</b> .....	36
<b>Esquema general de trabajo</b> .....	38
<b>Obtención del reflector de Bragg</b> .....	39
<b>Esquema general de trabajo</b> .....	42
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	43
<b>CONCLUSIONES</b> .....	54
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> . ....	56
<b>ANEXO A</b> .....	60
<b>ANEXO B</b> .....	61

## RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo la construcción de un sensor óptico construido con una microcavidad de silicio poroso y su aplicación para la identificación bacteriana. Las propiedades físicas del silicio poroso nos permiten emplearlo como un sensor; en el silicio poroso se puede modular las propiedades ópticas de cada capa porosa permitiendo la formación de un dispositivo interferencial óptico denominado reflector de Bragg. Los dispositivos ópticos de silicio poroso se basan en el cambio del índice de refracción efectivo debido a la presencia de moléculas en la nanoestructura que modifica su respuesta espectral.

El silicio poroso se obtuvo mediante anodización, que consiste en sumergir obleas de silicio monocristalino tipo-p en una solución de ácido fluorhídrico-etanol y exponer las obleas a una corriente específica durante el período de tiempo deseado.

Las bacterias analizadas fueron: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, dichas bacterias fueron previamente identificadas por métodos fenotípicos.

Las lecturas se realizaron con dos métodos diferentes; la primera lectura se realizó con la bacteria colocada sobre silicio cristalino y leído con espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) y la segunda lectura se realizó con la bacteria colocada sobre el reflector de Bragg y leída con el método de espectroscopia de Ultravioleta visible.

La espectroscopia FTIR es un método basado en la medición de la vibración de una molécula excitada por radiación IR en un rango de longitud de onda específico. Los espectros FTIR de las células bacterianas se pueden utilizar para analizar su composición total, incluyendo proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos (LPS). Como resultado de esta técnica se obtuvieron cuatro espectros perfectamente diferenciados de las bacterias de interés en la región de bajos números de onda y se realizó un análisis de los espectros.

La espectroscopia UV-Vis es una técnica de medición basada en la absorción de radiación UV y/o visible por parte de las moléculas que componen a una sustancia, esta técnica nos permitió medir el máximo de reflectancia de cada bacteria y utilizando la ecuación de Bruggeman se logró obtener el índice de refracción de cada elemento biológico, parámetro que pudiera ser considerado para la obtención de una base de datos.

## **INTRODUCCIÓN.**

Una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos asociados a infecciones.

El desarrollo en las últimas décadas de la rama de la ciencia de materiales ha sido relevante debido a un nuevo enfoque y al descubrimiento de nuevas estrategias en el tratamiento y aplicación de estos materiales en diversas áreas, todo ello ha sido posible gracias a la integración multidisciplinar de conocimientos y equipos humanos para trabajar en un mismo objetivo.

Un semiconductor es un material que conduce la electricidad de menor manera que un conductor y mayor que un aislante. El semiconductor más utilizado en el desarrollo de tecnología es el silicio, que es el elemento más abundante en la naturaleza. Por otro lado, el silicio poroso (SP) es un material con una alta reactividad química que permite la posibilidad de convertirlo en biocompatible y su importancia en aplicaciones biomédicas es debido a sus notables propiedades estructurales y optoelectrónicas, este se obtiene de obleas de silicio cristalino y sus propiedades fisicoquímicas se ven influenciadas por su entorno químico. Esta influencia ha permitido el desarrollo de todo tipo de sensores basados en este material, tanto óptico como eléctrico o químico, dependiendo del cambio producido, por lo que causa un gran interés para la fabricación de sensores. Todo sensor necesita de un elemento sensible a la interacción del sistema sensor-analito y que transporte una señal hasta un dispositivo de medida y procesamiento de la información capturada, dicho elemento se conoce como transductor. En la literatura los sensores ópticos son estudiados mediante algún tipo de espectroscopia.

La espectroscopia es el estudio de la radiación electromagnética y la materia, la cual está formada por la combinación de los campos eléctricos y magnéticos que se propagan en el espacio en forma de ondas que contienen energía, estas ondas viajan a través del espacio y no necesitan un medio para su propagación. El espectro electromagnético es clasificado por las radiaciones electromagnéticas mediante la longitud de onda o frecuencia a la cuales viajan.

La espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis) se basa en los procesos de interacción de la radiación con la materia y el rango se encuentra entre los 160 y 780 nm. La absorción de esta radiación genera la excitación de los electrones; estos deben ser los electrones de valencia, eso quiere decir los que se presentan en los enlaces de los compuestos. Las transiciones electrónicas a orbitales moleculares externos son denominadas transiciones Rydberg que están presentes en la región visible y Ultravioleta. Dentro del espectro se observan los picos de absorción que se pueden relacionar con los distintos enlaces funcionales presentes en la molécula. Sus bandas son anchas debido a la superposición de transiciones vibracionales.

El espectro infrarrojo es utilizado para observar los movimientos vibracionales, en ellos los distintos átomos imprimen su propio movimiento. De las principales vibraciones podemos clasificar los distintos modos por las deformaciones de enlace, deformaciones fuera del plano entre otros. Así dependiendo del enlace que se tenga entre los átomos es cómo podemos observar un movimiento específico de vibración.

Dentro de las funciones de los laboratorios de microbiología está la identificación de microorganismos implicados en procesos infecciosos, mayormente en los agentes etiológicos responsables, para determinar su patogenicidad. Estos métodos tradicionales requieren mayor tiempo de tratamiento, ser incubados por 24 horas y posteriormente hacer pruebas bioquímicas para su identificación concreta. Un examen de microscopia en tinción de Gram revelará las características de la pared celular. Todos estos exámenes requieren por lo menos de uno a dos días de trabajo para el desarrollo de los cultivos.

## MARCO TEÓRICO

### *Pseudomonas aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* es el principal patógeno que se encuentra dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, se identifica por ser una bacteria gramnegativa ligeramente arqueada. Al cultivo la bacteria emana un característico olor a uvas o nixtamal, también se puede ver la fluorescencia bajo luz ultravioleta, estas bacterias crecen a 42 °C y miden casi 0.6 x 2 µm (Tubón y David, 2017).

Es uno de los patógenos intrahospitalarios globalmente dominantes, ocasiona una amplia gama de infecciones, algunas tan severas como la neumonía o bacteriemia, cuadro que se complica aún más debido a su resistencia intrínseca a diversos antibióticos y a su notable capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, asociándola a elevados índices de mortalidad y convirtiéndola en un serio problema de salud pública.

*P. aeruginosa* es un habitante común de agua, suelos y plantas. En los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud; es un patógeno oportunista, particularmente en los pacientes con inmunosupresión, así como aquellos que han sufrido quemaduras severas, neutropenia inducida por quimioterapia o presentan enfermedades pulmonares subyacentes están propensos a desarrollar la infección. (Roca, 2014).

*P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación estructural entre sí, debido a la disminución de la permeabilidad de su membrana externa, a la expresión constitutiva de varias bombas de expulsión y a la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos. Además, posee la capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia vía mutaciones (Roca, 2014).

Características generales.

Son bacilos gramnegativos cortos, en parejas, en cadenas o aislados (Figura 1).

Presenta un metabolismo bacteriano aerobio estricto-oxidativo, no fermenta carbohidratos, sus exigencias nutricionales son sencillos, secreta sustancias con una pigmentación hidrosoluble.



Figura 1. Observación a microscopio con objetivo 100X de *Pseudomonas aeruginosa* con tinción de gram

Fuente: <http://textbookofbacteriology.net>

Morfología colonial.

Son colonias grandes, pueden ser lisas, rugosas, mucoides o secas, en agar sangre algunas cepas presentan Beta hemólisis (Figura 2).



Figura 2. *Pseudomonas aeruginosa* en agar Sangre de Carnero.

Fuente: scielo.sld.cu

## ***Escherichia coli.***

El género *Escherichia* son bacilos gramnegativos que existen solos o en pares.

*E. coli* es un anaerobio facultativo con un tipo de metabolismo fermentador. Son bacilos tanto móviles como no móviles por flagelos peritricos (flagelos distribuidos uniformemente en la superficie bacteriana) (Rivera, 2018), sobrevive a pH de entre 4.4-9 y pertenece a la familia de las enterobacterias (Aguilar, 2015).

*Escherichia coli* (*E. coli*) es uno de los agentes causales más frecuentes de procesos infecciosos nosocomiales y hoy en día adquiridos en la comunidad. Es reconocida como una de las principales enterobacterias no sólo por su alta prevalencia, sino por su capacidad de generar resistencia a los diferentes antimicrobianos.

*Escherichia coli* es una bacteria comensal que forma parte de la microbiota del intestino de humano y animales. La mayoría de *E. coli* son inocuas para la población humana. Sin embargo, existen grupos que pueden causar enfermedades, tales como *E. coli* diarreogénicas (Aguilar, 2016).

Características generales.

Bacilos gramnegativos que miden 3 µm de largo por 0.5 µm de ancho (Figura 3).

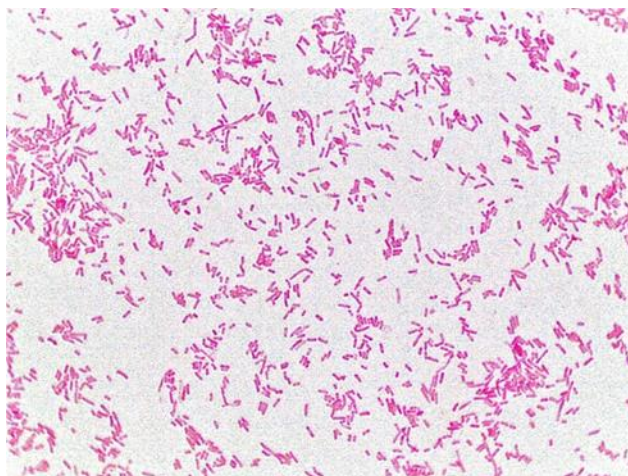


Figura 3. Observación a microscopio con objetivo 100X de *Escherichia coli* con tinción de gram

Fuente: faculty.ccbcmd.edu

Morfología colonial.

En agar MacConkey son colonias rosas, opacas, circulares, de 2 a 4 mm de diámetro, convexas, de bordes enteros (Figura 4).



Figura 4. Colonias de *Escherichia coli* en Agar MacConkey  
Fuente: cepario unicach

### ***Staphylococcus aureus.***

Los estafilococos son un amplio grupo de bacterias grampositivas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Se caracterizan porque se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva y, a la fecha, se han reportado 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*. Dicho género tiene una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes de laboratorio. Es por ello por lo que, gracias a su fácil propagación, pueden transmitirse de una especie a otra, siendo frecuentes los casos humano-animales y viceversa. (Zendejas *et al*, 2014)

Es considerado uno de los microorganismos más importantes en la práctica médica diaria. Es capaz de provocar una amplia gama de enfermedades, ya sea por acción directa o mediante la acción de sus toxinas. *Staphylococcus aureus* tiene gran capacidad para colonizar la piel y las mucosas de los seres humanos y de diferentes animales (Hilario y Vilchez, 2018).

Los seres humanos representan su mayor reservorio, encontrándose que aproximadamente entre el 10% y el 40% de niños y adultos son portadores nasales del microorganismo, también presentes en la piel, heces y orofaringe (Henaó *et al*, 2017)

El crecimiento ocurre en un amplio rango de temperatura 6.5 a 50 °C, siendo óptimo 30-40 °C.

Características generales.

Es un coco grampositivo (Figura 5), muy resistente en el medio ambiente y ampliamente distribuido en la naturaleza, es inmóvil, de un tamaño entre 0.8 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se divide en tres planos para formar racimos de uvas, es aerobio y anaerobio facultativo. Es capaz de crecer hasta con un 10% de NaCl.

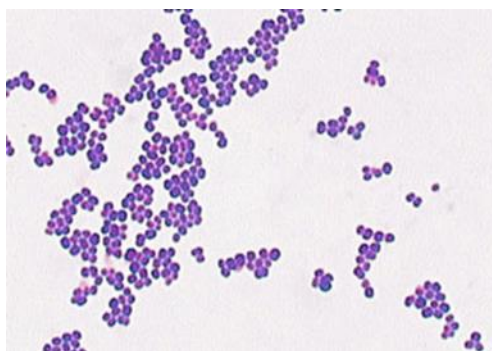


Figura 5. Observación microscópica con objetivo 100X de tinción de gram de *Staphylococcus aureus*  
Fuente: biology libre texts

Morfología colonial.

Son colonias lisas, brillantes y convexas, poseen un endopigmento color amarillo-naranja a blanco porcelana color dorado al cual se le conoce como “aureus”.

*S. aureus* se caracteriza por crecer en medios de cultivo que contienen sangre como colonias típicas de consistencia cremosa, pigmentadas de color dorado y con un halo de  $\beta$ -hemólisis a su alrededor (Figura 6), bioquímicamente destaca la producción de enzimas como catalasa y coagulasa, la capacidad de fermentar manitol y trehalosa, y la producción de una nucleasa estable al calor (termonucleasa) (Spohr *et al*, 2011).

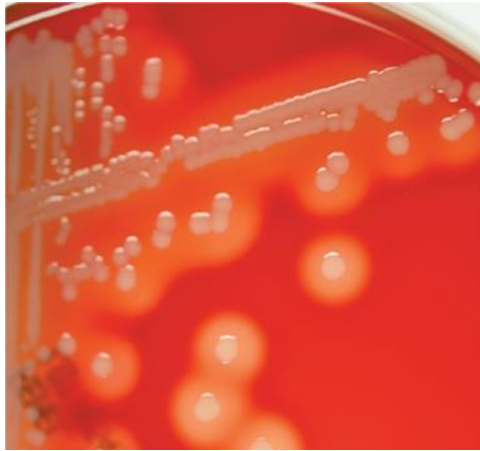


Figura 6. Colonias de *Staphylococcus aureus* en agar Sangre de Carnero.  
(Brooks *et al*, 2000)

### ***Staphylococcus epidermidis***

El grupo de *Staphylococcus* coagulasa negativos está constituido por un gran número de especies, *S. epidermidis* es una de las especies que más frecuentemente se aísla.

*S. epidermidis* es capaz de producir macromoléculas de superficie y extracelulares, que inician y luego aumentan la adhesión bacteriana a la superficie plástica de cuerpos extraños.

Las infecciones causadas por *S. epidermidis* se relacionan con la colonización de cuerpos extraños, especialmente en el paciente hospitalizado. En el caso de la colonización de catéteres intravenosos, puede aparecer flebitis y fiebre, y eventualmente se produce una bacteriemia y sepsis. La colonización de válvulas cardíacas protésicas puede producir endocarditis precoces y tardías (Macedo y Mateos, 2006).

La utilización de otros dispositivos como prótesis osteoarticulares, catéteres peritoneales y derivaciones de líquido cefalorraquídeo, también pueden ser susceptibles a contaminación por *S. epidermidis*.

La mayoría de las veces que aislamos *S. epidermidis* de una muestra clínica en el laboratorio de microbiología, este constituye un contaminante. Esta especie, al ser microbiota

normal de piel, muchas veces contamina las muestras al momento de la toma, creando dificultades para interpretar los resultados de los cultivos. Es el contaminante más importante en muestras de hemocultivo, líquidos biológicos o exudados de herida, donde su aislamiento debe ser interpretado con precaución, teniendo en cuenta las condiciones de extracción de la muestra y la condición clínica del paciente (Macedo y Mateos, 2006).

Características generales.

Son cocos grampositivos (Figura 7), catalasa positivos que poseen tendencia a agruparse en racimos. Tienen una forma esférica y un diámetro de alrededor de una micra.



Figura 7. Observación microscópica con objetivo 100X de tinción de gram de *Staphylococcus epidermidis*  
Fuente: faculty.weber.edu

Morfología colonial.

En agar sangre *S. epidermidis* no presenta hemólisis y presenta colonias generalmente pequeñas y no presentan pigmentación (Figura 8).



Figura 8. Colonias de *Staphylococcus epidermidis* en agar Sangre de Carnero.  
Fuente: mediagraphic.com

### **Espectroscopia infrarroja (IR).**

El espectro infrarrojo es dividido en tres regiones; la región cercana que comprende de 0.7-5  $\mu\text{m}$ , el mediano infrarrojo que va de los 5- 30  $\mu\text{m}$  y finalmente el lejano infrarrojo que va de los 30 a 1000  $\mu\text{m}$ , esto nos dice que la longitud de onda de la radiación infrarroja está comprendida entre los 4000 y 7000  $\text{\AA}$  (0.4 y 0.7  $\mu\text{m}$ ). La radiación infrarroja es producida por cuerpos calientes debido a los cambios en los estados de energía de los electrones en los orbitales de los estados vibracionales y rotacionales de los enlaces moleculares.

El espectro infrarrojo es utilizado para observar los movimientos vibracionales, en ellos los distintos átomos imprimen su propio movimiento. De las principales vibraciones podemos clasificar los distintos modos por las deformaciones de enlace, deformaciones fuera del plano entre otros. Así dependiendo del enlace que se tenga entre los átomos es cómo podemos observar un movimiento específico de vibración (Lamprell *et al*, 2006).

Procedimientos taxonómicos tradicionales para identificación y clasificación de especies de bacterias, tienden a consumir tiempo y a menudo son necesarias varias pruebas para la identificación de varias especies. Además de métodos como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la espectroscopia FTIR (Infrarroja con Transformada de Fourier) introduce una posibilidad de un método rápido de identificación y discriminación de microorganismos (Lamprell *et al*, 2006).

En los últimos años, técnicas basadas en espectroscopia vibracional, tales como espectroscopia infrarroja han demostrado ser una herramienta poderosa para la caracterización microbiana. Esta técnica es rápida, requiere escasa biomasa, es fácil

implementar y puede llegar a ser muy efectiva en lo que se refiere a costos, al reducir la manipulación y el uso de reactivos (Nieto *et al*, 2004).

El espectro infrarrojo de un microorganismo es considerado una verdadera huella dactilar. El mismo es el resultado de la absorción de todos los modos vibracionales de las moléculas que componen la célula (ADN, ARN, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, componentes de membrana y pared celular). Por lo tanto, IR es un método que depende del estado fisiológico del microorganismo analizado ya que el espectro generado refleja la composición bioquímica de las células en estudio (Nieto *et al*, 2004).

Para comprender los espectros de FTIR, un requisito es el conocimiento fundamental de las características de la superficie y la composición celular de las bacterias. Los espectros de IR (Figura 9) medidos para células intactas de bacterias suelen ser complejos y los picos son amplios debido a la superposición de contribuciones de todas las biomoléculas presentes en una célula bacteriana (Davis y Mauer, 2010).

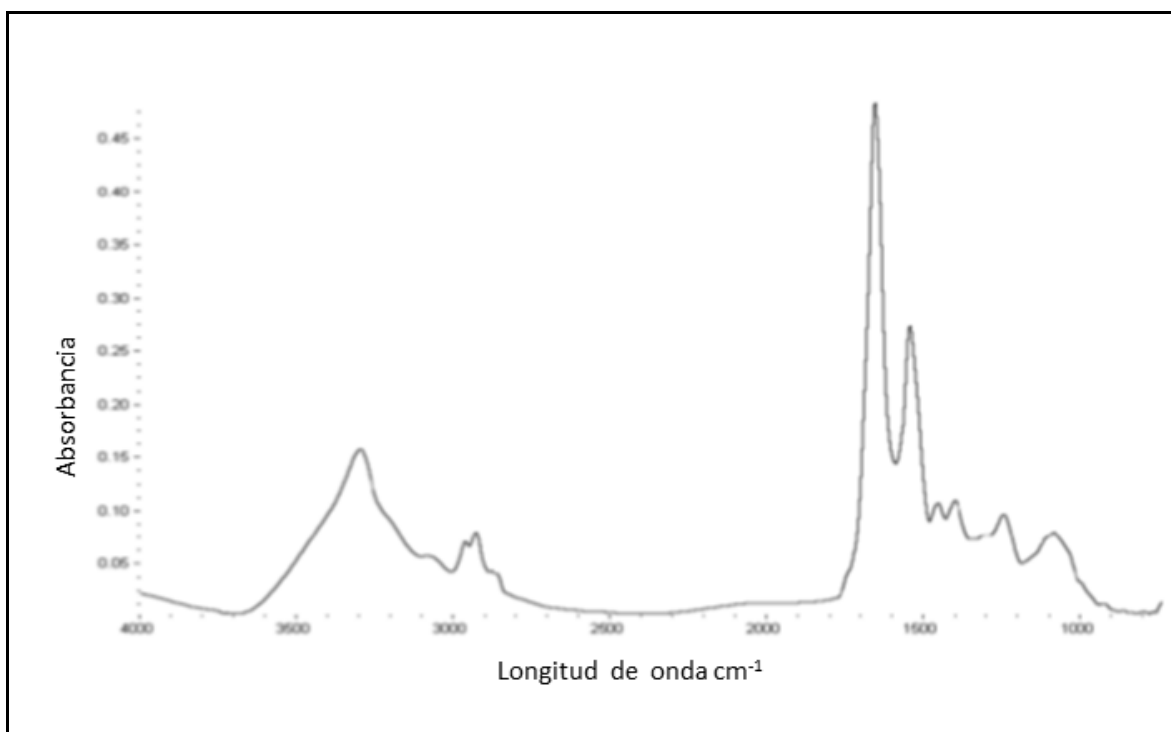


Figura 9. Espectro de absorción FTIR de una bacteria gramnegativa, *Salmonella* entérica (R. Davis).

## **Transformada de Fourier.**

Es un análisis frecuencial de las señales. Es decir, si se tiene una señal de variable independiente continua (por ejemplo, una señal de energía o potencia) en función del tiempo, pero se presenta que esta señal no tiene una frecuencia definida porque no es periódica entonces se puede trabajar esta señal con Transformada de Fourier.

La transformada de Fourier es una herramienta matemática en donde se trabaja con una señal que esté en función de otra variable diferente del tiempo que indique como se distribuye la energía o la potencia en función de la frecuencia. En espectroscopia infrarroja transforma datos de distancia y frecuencia a datos de absorción y longitud de onda (González, 1997).

Las señales no periódicas también pueden ponerse como combinación lineal de exponenciales complejas, para expresarlo de esta manera se debe cumplir con los siguientes puntos:

- La expresión de la variable debe ser integrable.
- La integral definida de esta variable en un intervalo finito debe presentar un número finito de máximos, un número finito de mínimos, así como también un número finito de discontinuidades (González, 1997)

Para aplicar la Transformada Fourier a señales no periódicas se emplea la siguiente ecuación:

$$x(t) = \int_{-\infty}^{\infty} X(f) e^{j2\pi ft} df$$

## **Espectroscopia UV-Vis.**

La interacción de la radiación con la materia es una fuente importante de información sobre las sustancias químicas. El estudio de esta interacción se realiza a través del empleo de diferentes técnicas de espectroscopia. La espectroscopia óptica se basa en la relación de frecuencias Bohr-Einstein

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu,$$

que correlaciona los estados energéticos discretos, atómicos o moleculares  $E_i$ , con la frecuencia de la radiación electromagnética  $\nu$ . Donde  $h$  es la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$  o  $6.626 \times 10^{-27} \text{ erg s}$ ).

Los cambios energéticos también pueden definirse en función de la longitud de onda

$$\Delta E = E_2 - E_1 = hc\tilde{\nu},$$

donde

$$\nu = c/\lambda = c\tilde{\nu}.$$

La espectroscopia UV-Vis es una técnica de medición basada en la absorción de radiación UV y/o visible por parte de las moléculas que componen a una sustancia. Esta espectroscopia se trabaja en un intervalo de longitud de onda de 200 a 800 nm, brindando información de los estados energéticos, atómicos o moleculares, de la muestra de estudio (Cubas *et al*, 2018).

El instrumento empleado para la obtención de un espectro UV-Vis recibe el nombre de espectrofotómetro (Figura 10), está compuesto por una fuente de radiación UV y visible, generalmente se utilizan lámparas de deuterio, wolframio y/o xenón; un monocromador compuesto por un colimador de entrada, un elemento dispersante y un colimador de salida, su función es seleccionar la longitud de onda que incidirá en la muestra; finalmente uno o más detectores son encargados de medir la intensidad de la radiación proveniente de la muestra, formando un espectro de absorción y/o transmisión según se requiera.

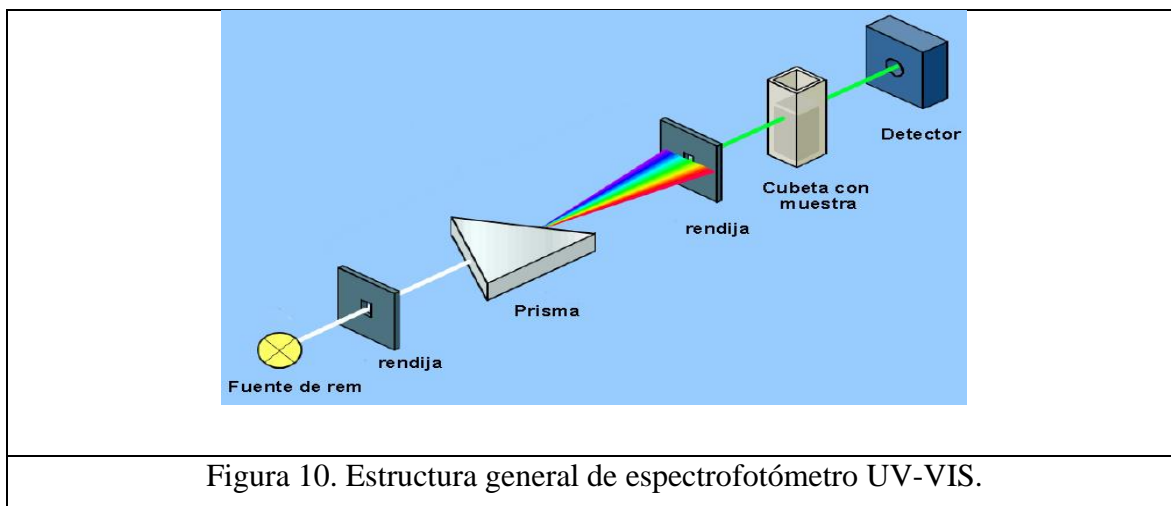
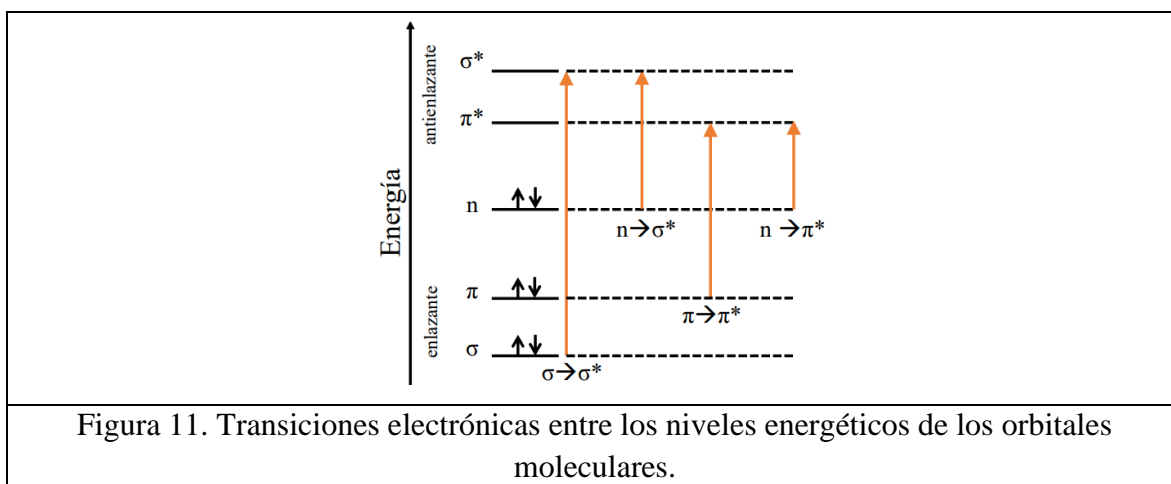


Figura 10. Estructura general de espectrofotómetro UV-VIS.

Aunque la espectroscopia UV-Vis trabaja en un intervalo estrecho del espectro electromagnético, la información que genera es de suma importancia. Ésta es la espectroscopia más ampliamente utilizada de manera global y ha sido empleada en diversas aplicaciones en el área biológica, esta técnica permite determinar la concentración de una solución mediante la ley de Beer-Lambert, así como la absorción molar y el coeficiente de extinción (Cubas *et al*, 2018).

En las moléculas orgánicas, los orbitales moleculares asociados con los enlaces sencillos se designan como orbital sigma ( $\sigma$ ), el doble enlace en una molécula orgánica contiene dos tipos de orbitales moleculares, un orbital  $\sigma$  correspondiente a un par de electrones enlazantes y un orbital molecular pi ( $\pi$ ) asociado con el otro par de electrones. También se pueden encontrar orbitales  $n$  conformados por electrones libres desapareados asociados con heteroátomos y tienen un carácter no-enlazante. Los orbitales moleculares  $\sigma$ ,  $\pi$  y  $n$ , están conformados por la superposición de los orbitales atómicos de los átomos que conforman a la molécula; los orbitales  $\sigma$  están conformados por la combinación de los orbitales atómicos s y p, y pueden ser de tipo enlazante ( $\sigma$ ) o antienlazante ( $\sigma^*$ ). Los orbitales  $\pi$  se conforman por la combinación de orbitales p de forma perpendicular al eje de enlace y de la misma manera puede ser de tipo enlazante ( $\pi$ ) o antienlazante ( $\pi^*$ ) (Figura 11). Al absorber energía, los electrones de los orbitales  $\sigma$ ,  $\pi$  y  $n$  pueden pasar a un estado excitado generando transiciones electrónicas a los niveles energéticos  $\sigma^*$ ,  $\pi^*$  (Cubas *et al*, 2018).



## Materiales semiconductores.

Los semiconductores ocupan una posición intermedia en la escala de conductividades entre los conductores y los aislantes. La resistividad de los buenos conductores, como el cobre, es del orden de  $10^{-6} \Omega \text{ cm}$  y la de los buenos aislantes supera los  $10^{12} \Omega \text{ cm}$ , mientras que la de los semiconductores ocupa prácticamente todo el intervalo limitado por los dos valores anteriores.

En la Tabla 1, se muestra una parte de la tabla periódica en la que aparecen los principales semiconductores. Se indica en cada celda el número atómico del elemento y en cada columna se muestra el número de valencia de los elementos.

Tabla 1. Parte de la tabla periódica en la que figuran los elementos que juegan un papel importante en la electrónica de los semiconductores.

II	III	IV	V	VI
<sup>4</sup> Be	<sup>5</sup> B	<sup>6</sup> C	<sup>7</sup> N	<sup>8</sup> O
<sup>12</sup> Mg	<sup>13</sup> Al	<sup>14</sup> Si	<sup>15</sup> P	<sup>16</sup> S
<sup>30</sup> Zn	<sup>31</sup> Ga	<sup>32</sup> Ge	<sup>33</sup> As	<sup>34</sup> Se
<sup>48</sup> Cd	<sup>49</sup> In	<sup>50</sup> Sn	<sup>51</sup> Sb	<sup>52</sup> Te
<sup>80</sup> Hg	<sup>81</sup> Tl	<sup>82</sup> Pb	<sup>83</sup> Bi	<sup>84</sup> Po

En la Tabla 1, se muestran los principales semiconductores utilizados en aplicaciones electrónicas. Se puede trabajar con semiconductores simples como el silicio (Si) y el germanio (Ge) y semiconductores compuestos. Entre éstos se hallan los binarios IV-IV, III-V y II-VI – formados por parejas de elementos procedentes cada uno de ellos de las columnas indicadas- y las aleaciones constituidas por tres o más elementos (Tabla 2), como son los compuestos ternarios y cuaternarios.

Tabla 2. Tipos de semiconductores utilizados en aplicaciones electrónicas.

Tipos de semiconductores	Ejemplos
Semiconductores simples	Si, Ge
Semiconductores compuestos IV-IV	SiC, SiGe
Semiconductores compuestos III- V	GaAs, GaP, GaSb, AlAs, AlP, AlSb, InAs, InP, InSb
Semiconductores compuestos II-VI	ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe
Aleaciones	AlGaAs, GaAsP, HgCdTe, GaInAsP

Semiconductor intrínseco: Se denomina semiconductor intrínseco al semiconductor puro y perfectamente cristalino. En el semiconductor intrínseco los portadores se generan exclusivamente por la ruptura de enlaces covalentes. En consecuencia, el número de electrones de conducción y el de huecos son iguales. Ese número de portadores se calcula a partir de las densidades de electrones libres  $n$  y de huecos  $p$ , es decir, a partir del número de portadores por unidad de volumen. Como en los semiconductores la unidad de longitud utilizada habitualmente es el centímetro,  $n$  representa el número de electrones libres por  $\text{cm}^3$  y  $p$  el número de huecos por  $\text{cm}^3$ . Por tanto, en un semiconductor intrínseco  $n = p = n_i$ , siendo  $n_i$  la concentración intrínseca.

La concentración intrínseca depende del valor de la energía del ancho de banda prohibida ( $E_g$ ) y de la temperatura. Efectivamente, si  $E_g$  aumenta se debe proporcionar más energía a un electrón de valencia para que pueda romper el enlace, por lo cual el número de enlaces rotos en una determinada temperatura, es decir,  $n_i$ , es menor. Si la temperatura aumenta hay más energía térmica disponible, es decir, más cuantos de energía térmica, y por lo tanto hay un mayor número de electrones que han podido absorber un cuanto y convertirse en electrones de conducción, lo cual provoca el aumento de  $n_i$  (Prat y Calderer, 2010).

El semiconductor más utilizado en la industria electrónica es el silicio (Si), en un porcentaje superior al 95%. Este material está presente en los dispositivos que conforman los circuitos integrados que forman parte de nuestro día a día. Las aleaciones de germanio y

silicio (SiGe) son empleadas en circuitos integrados de alta velocidad para radares y amplificadores de instrumentos electrónicos, como, por ejemplo, guitarras eléctricas.

Otro ejemplo de semiconductor es el arseniuro de galio (GaAs), ampliamente utilizado en amplificadores de señales, específicamente de señales con alta ganancia y bajo nivel de ruido (Torres, 2014). Una técnica poco utilizada en síntesis de materiales semiconductores es la electroquímica, la cual representa una alternativa ya que su implementación es accesible en cuanto a costos.

### **Electroquímica.**

Las técnicas electroquímicas son una poderosa herramienta para la cuantificación de analitos y para la determinación de parámetros termodinámicos y cinéticos en reacciones electroquímicas, esto es, en procesos químicos heterogéneos que involucran la transferencia de electrones entre una superficie de material conductor llamada electrodo, que generalmente es un metal y un conductor iónico, que generalmente suele ser una disolución que contiene un electrolito. Además de la transferencia de electrones, es necesario que los reactivos estén disponibles en la superficie del electrodo y, por lo tanto, los procesos de transferencia de masa también son importantes. Junto a las reacciones electroquímicas, pueden ocurrir procesos como:

1. Reacciones químicas acopladas a los reactivos y/o productos de reacción.
2. Adsorción de los reactivos, intermediarios o productos sobre la superficie del electrodo
3. Formación de nuevas fases, como en el caso de la formación de depósitos metálicos, la cual involucra procesos de nucleación y crecimiento (Sandoval, 2015).

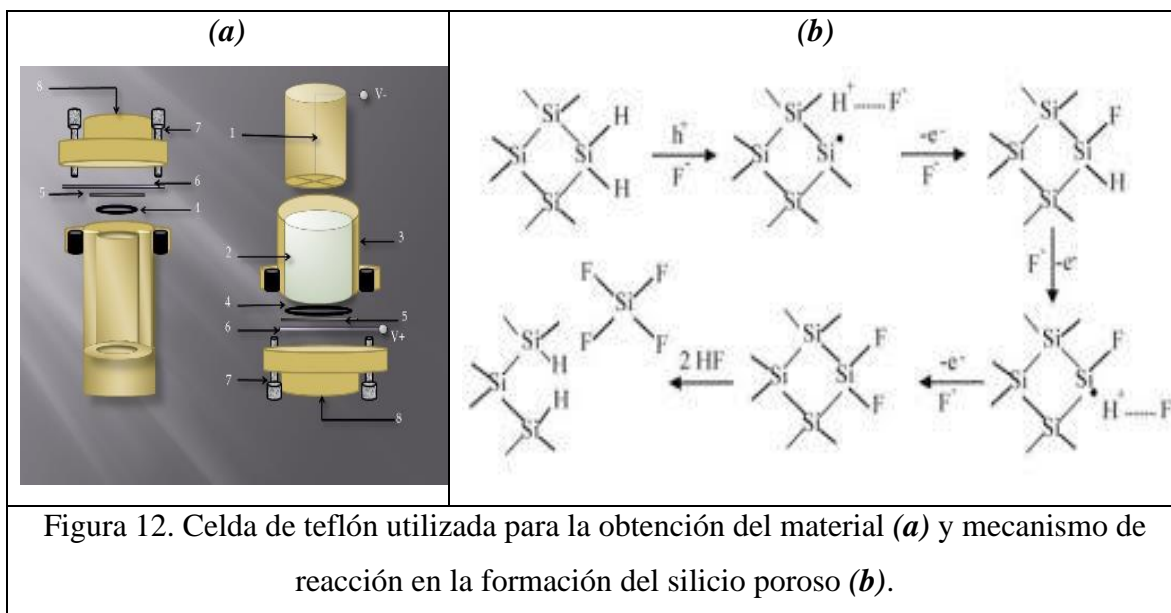
### **Silicio poroso (SP).**

El silicio poroso se produce mediante anodización, que consiste en sumergir obleas de silicio monocristalino tipo-p o tipo-n en una solución de ácido fluorhídrico-etanol y exponer las obleas a una corriente específica durante el período de tiempo deseado. La anodización es el método más comúnmente utilizado para producir SP.

El control adecuado de las estructuras porosas es complicado porque depende de varios factores. La densidad de corriente, la concentración de HF (ácido fluorhídrico), la agitación electrolítica, el tipo de dopaje (tipo p y/o n), la orientación del silicio cristalino, la resistividad y temperatura, el tiempo de ataque, la iluminación o longitud de onda durante el proceso de síntesis son factores clave que afectan las estructuras de este material.

La oblea de silicio actúa como el ánodo, mientras que el cátodo está hecho convencionalmente de platino o tungsteno. La celda de anodización está elaborada de un polímero llamado Teflón, que es resistente a los ácidos.

La formación de poros en la oblea de silicio sigue el mecanismo mostrado en la Figura 12 (b), donde (1) debido a la baja polarización entre los átomos de hidrógeno y silicio, el ion fluoruro de la solución de electrolito basada en HF ataca la superficie de silicio saturada de hidrógeno mientras hay ausencia de huecos de electrones; (2) El enlace Si-F se forma por ataque nucleofílico sobre el Si-H mediante un ion fluoruro si un hueco alcanza la superficie; (3) la polarización debida al enlace Si-F influye en el segundo ataque del ion fluoruro, reemplazando el enlace de hidrógeno restante e introduciendo dos átomos de hidrógeno de un electrón en el sustrato; (4) después de la polarización, los enlaces Si-F reducen la densidad de electrones de los enlaces posteriores Si-Si, y éstos lo hacen susceptible de ser atacado por HF o H<sub>2</sub>O; (5) el fluoroanión SiF<sub>6</sub> altamente estable es el producto de reacción del ataque electroquímico al Silicio cristalino, dejando en su lugar una estructura porosa (Cartes y Pereira, 2016).



Un material poroso es aquel que está compuesto por dos fases: una matriz sólida y en su interior un sistema de huecos (poros) que pueden o no estar interconectados entre sí. Estos últimos pueden tener geometrías y tamaños variados dependiendo del origen de su formación.

La IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) considera el diámetro interno del poro asumiendo que éste es cilíndrico, o bien, la distancia entre las paredes internas y opuestas de un poro con diferente configuración. Con base en estas condiciones los materiales se pueden clasificar como materiales microporosos, macroporosos y mesoporosos; estos últimos por definición tienen un tamaño de poro en el rango de 2-50 nm.

Los materiales microporosos normalmente son generados desde la estructura cristalina de los materiales y se extienden a lo largo de todo el cristal formando canales. En otras palabras, los microporos son parte de la estructura cristalina del material y, por lo tanto, son inherentes al mismo.

Por el contrario, en los materiales mesoporosos y macroporosos, los poros no son generados dentro de la estructura cristalina del material, sino que se forman por la interconexión entre cristales o partículas, como ocurre en los óxidos metálicos donde los cristales son totalmente densos y éstos se aglomeran para formar partículas, dejando volúmenes vacíos entre ellas.

Es importante destacar que los materiales de silica mesoporosos son de interés en muchas aplicaciones, como catálisis, liberación de medicamentos, tecnología de separación, sensores químicos, nanoreactores y fotónica, ya que poseen una gran área superficial, estabilidad térmica, biocompatible y de bajo costo. El tamaño de los poros de estos materiales se encuentra comúnmente por debajo de los 15 nm (Cartes y Pereira, 2016).

Los tipos de poros que se encuentran en el SP son generalmente cilíndricos. Pueden estar interconectados y ramificados o sin salida. Otras morfologías de poros que pueden existir en SP son poros cerrados que no tienen una abertura a la superficie o a través de poros que se extienden a través de una membrana porosa. Se puede producir una amplia gama de áreas superficiales, desde  $<1 \text{ m}^2/\text{g}$  para macroporos a  $800 \text{ m}^2/\text{g}$  para microporos, las cuales dependen de los parámetros empleados durante el proceso de síntesis. Por ejemplo, al aumentar la concentración de HF se observa un aumento en el área superficial, mientras que un incremento de la densidad de corriente y el tiempo de anodización resulta en disminuciones en el área superficial. El sustrato de silicio también influye en el tamaño de poro ya que las obleas tipo-n producen tamaños de poro de 25-40 nm, mientras que la anodización de las obleas del tipo-p producen un diámetro promedio de poro de 100 nm. Por otra parte, está reportado que la porosidad aumenta al incrementar la densidad de corriente y al disminuir la concentración de HF (Contreras, 2018).

### **Reflector de Bragg.**

Los Reflectores Bragg Distribuidos (RBD) son cristales fotónicos unidimensionales que se obtienen alternando capas de silicio poroso con distinto índice de refracción, pero de igual espesor óptico. Presentan una gran reflectancia para una banda centrada en una longitud de onda igual a cuatro veces el espesor óptico de las capas individuales (Pavesi *et al*, 1996) como se muestran en la Figura 13, esta condición es válida para incidencia normal.

La operación principal puede entenderse como sigue: debido al cambio de índice de refracción, cada interfaz entre los dos materiales aporta una reflexión de Fresnel (Merrill *et al*, 1999). Para una longitud de onda determinada, la diferencia de camino óptico entre las reflexiones posteriores de interfaces es la mitad de la longitud de onda. Por lo tanto, todos los componentes reflejados de las interfaces interfieren constructivamente, lo que resulta en

una alta reflexión final de una región centrada en la longitud de onda elegida. La reflectividad obtenida se determina por el número de pares de capa y por la diferencia entre el índice de refracción de las capas del material (Weiss, 2005).

## Pila de cuarto de onda

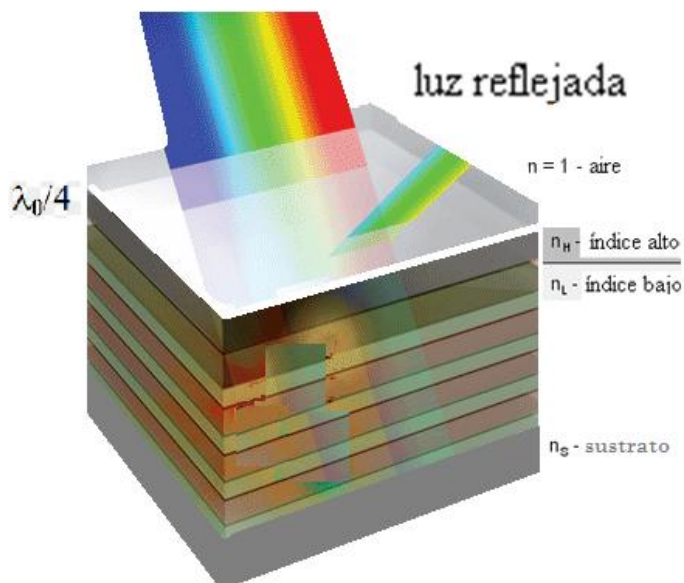


Figura 13. Pila de un cuarto de onda de índices de refracción altos y bajos alternados.

Si deseamos un reflector de Bragg con una alta reflectancia debemos alternar una pila de índice de refracción, alto  $n_H$  y de bajo  $n_L$ . El espesor óptico  $d$  de cada capa debe ser igual a  $1/4$  de la longitud de onda que se desea reflejar.

$$n_i d = \frac{1}{4} \lambda_0 \quad (\text{E.1})$$

Donde:

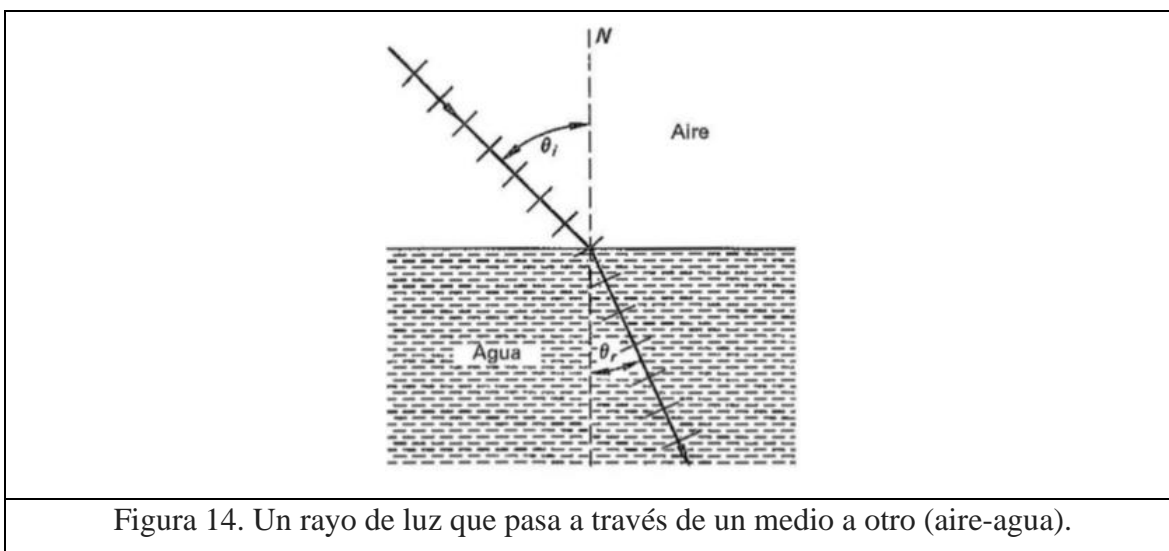
$n_i$ - es el índice de refracción que puede ser alto o bajo.

$\lambda_0$  -longitud de onda deseada.

## Refracción de la luz.

La refracción del espectro electromagnético es una teoría desarrollada del matemático Descartes y el astrónomo Snell, por lo mismo la ley de la refracción es llamada también Ley de Snell-Descartes. Este tratado describe “La relación entre los ángulos de incidencia y el ángulo de la luz refractada”. Cuando la luz atraviesa de un medio a otro, se produce un cambio del ángulo de la luz saliente; esto se debe a que la luz viaja con una velocidad en el vacío y cambia de dirección repentinamente al atravesar por un medio con otro índice de refracción. El medio o material tiene un potencial refractivo llamado índice de refracción, que es la propiedad refractiva del material que indica la cantidad de dispersión en función a la luz que no es absorbida (Teran, 2016).

La luz se propaga en línea recta a velocidad constante en un medio uniforme. Si cambia el medio, la velocidad también cambiará y la luz viajará en línea recta a lo largo de una nueva trayectoria. La desviación de un rayo de luz cuando pasa oblicuamente de un medio a otro se conoce como refracción (figura 14).



La velocidad de la luz dentro de una sustancia material es generalmente menor que la velocidad en el espacio libre, donde es de  $3 \times 10^8$  m/s. En el agua la velocidad de la luz es de casi  $2.25 \times 10^8$  m/s, la cual es casi equivalente a las tres cuartas partes de su velocidad en el aire. La luz viaja aproximadamente a dos tercios de esa velocidad en el vidrio, o sea a unos

$2 \times 10^8$  m/s. La relación de la velocidad de la luz en el vacío entre la velocidad de la luz en un medio particular se llama el índice de refracción  $n$  para ese material.

El índice de refracción  $n$  de un material particular es la razón de la velocidad de la luz en el espacio libre con respecto a la velocidad de la luz a través del material.

$$n = c / v$$

### Las leyes de Refracción

Desde la antigüedad se conocen y se aplican dos leyes básicas de refracción (Figura 15).

1. El rayo incidente, el rayo refractado y la normal a la superficie se encuentran en el mismo plano.
2. La trayectoria de un rayo refractado en la frontera entre dos medios es exactamente reversible (Figura 15).

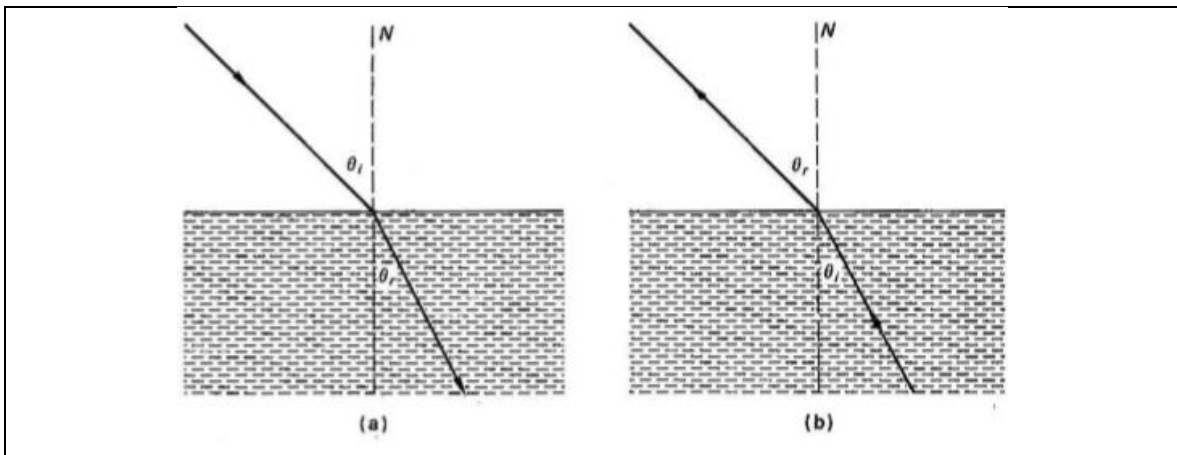


Figura 15. (a) El rayo incidente, el rayo refractado y la normal a la superficie están en el mismo plano. (b) Los rayos refractados son reversibles.

El índice de refracción es una cantidad adimensional y generalmente es mayor que la unidad. Para el agua,  $n = 1.33$ , y para el vidrio,  $n = 1.5$ . La Tabla 3 muestra los índices de refracción de diversas sustancias de uso común, los valores allí señalados se aplican al caso de una luz amarilla de 589 nm de longitud de onda. La velocidad de la luz en sustancias materiales es diferente para longitudes de onda diferentes. Este efecto es conocido como dispersión. Cuando la longitud de onda de la luz no se especifica, es común suponer que el índice corresponde al que tendría una luz amarilla.

Tabla 3. Índice de Refracción de la luz amarilla con longitud de onda de 589 nm (Alvarenga, 2002)

Sustancia	$N$	Sustancia	$N$
Benceno	1.50	Glicerina	1.47
Disulfuro de carbono	1.63	Hielo	1.31
Diamante	2.42	Cuarzo	1.54
Alcohol Etilico	1.36	Sal de roca	1.54
Agua	1.33	Circón	1.92

### Reflexión de la luz.

Cuando un haz de luz llega a la superficie de separación entre dos medios, parte de la luz se transmite, parte se absorbe y el resto es reflejada. Cuando la luz que se transmite por el aire incide sobre una superficie de vidrio, los átomos de éste absorben la luz y la irradian inmediatamente con la misma frecuencia en todas las direcciones. Las ondas radiadas hacia atrás por los átomos del vidrio interfieren constructivamente en un ángulo igual de incidencia, produciendo así la onda reflejada (Kane, 1989). La superficie lisa de un fragmento de vidrio o de metal pulido refleja la luz en una dirección particular. Esto se denomina reflexión especular. A veces la reflexión es difusa, y la luz reflejada se propaga en todas direcciones. Ello ocurre cuando la luz choca con una superficie como una hoja de papel o una pared pintada, que tienen irregularidades orientadas aleatoriamente y que son grandes en comparación con una longitud de onda. Cada sección lisa de tal superficie produce una reflexión especular, pero debido a las diversas orientaciones de estas secciones, el rayo reflejado total no tiene una dirección única.

En la reflexión especular hay una relación muy sencilla entre las direcciones del rayo incidente y el rayo reflejado.

Los rayos reflejados se hallan en el mismo plano que los rayos incidentes y la normal, y forman con la normal el mismo ángulo que los rayos incidentes.

Esta igualdad de los ángulos de incidencia y de reflexión es una propiedad general de las ondas. Se sigue el principio de Huygens y vale también para las ondas acústicas y para las ondas en agua.

Otras dos propiedades de la luz reflejada son también importantes. Cuando una onda luminosa incide sobre una superficie de separación desde un medio ópticamente menos denso a un medio más denso, las ondas reflejadas se invierten o cambian de signo. Por ejemplo, se presenta una inversión de fase en una superficie de separación aire-vidrio cuando la luz incide desde el aire. No ocurre inversión, en cambio, cuando la luz incide desde el vidrio, que es el medio ópticamente más denso.

En segundo lugar, la intensidad  $I_r$  de la onda reflejada viene determinada por los índices de refracción  $n_1$  y  $n_2$  de ambos medios (Tipler y Mosca, 2004)

### **Índice de refracción en silicio poroso.**

Los materiales porosos se distinguen porque sus características ópticas dependen fuertemente de sus propiedades estructurales (porosidad, tamaño y distribución del poro).

Un reflector Bragg se compone de una pila periódica de capas que alternan entre los índices de refracción alto y bajo con un alto contraste entre capas. Si cada capa satisface la condición de cuarto de longitud de onda, se puede construir un dispositivo selectivo que refleja una longitud de onda central.

Algunos biosensores de silicio poroso se basan en el cambio del índice de refracción efectivo debido a la presencia de moléculas en la nanoestructura que modifica su respuesta espectral, por lo que la determinación de los valores de índice de refracción precisos del material poroso es esencial (Acquaroli, 2012).

## MARCO DE REFERENCIA.

Hace algunos años que la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica que se está utilizando como método de identificación bacteriana. Gracias a que los microorganismos son bioquímicamente diferentes unos de otros, el espectro que generan actúa como una huella digital, permitiendo diferenciarlos en género, especie, tipo y serotipo. Esta diferenciación se basa en la distancia espectral entre microorganismos, cuanto más distancia haya entre los espectros mayor la diferencia bioquímica entre microorganismos.

En 2004 en Francia se utilizó espectroscopia FT-IR para discriminar a las diferentes especies de *Staphylococcus* y de manera más particular *S. aureus*, los resultados obtenidos no solo lograron caracterizar las diferentes especies de *Staphylococcus*, si no también permitió observar que ciertas especies son muy semejantes a *S. aureus*. (Lamprell *et al.*, 2006).

En el año 2015 en Argentina, se propuso identificar bacterias uterinas patógenas en vacas lecheras por medio de FT-IR y se buscó comparar los espectros obtenidos con la base de datos de bacterias uterinas de vacas lecheras europeas, se llegó a la conclusión de que la espectroscopia es una técnica que facilita y mejora la identificación de bacterias causantes de mastitis en vacas lecheras, al ser comparada con la identificación bacteriana por técnicas de rutina. (Jaureguiberru *et al.*, 2016)

En 2014 la Asociación de científicos y tecnólogos de alimentos en India realizaron un análisis, muestreando carne, pollo congelado y salami para poder detectar *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas ludensis* y *Salmonella enteritidis* (bacterias causantes de infecciones por transmisión alimentaria) con espectroscopia FT-IR, logrando detectar bacterias patógenas (*Salmonella enteritidis* y *Pseudomonas ludensis*) en los alimentos muestreados (Grewal *et al.*, 2015)

En el año 2015 en Berlín, Alemania, se hizo una caracterización rápida de *Klebsiella oxytoca* aislada de jabón líquido para manos usando los métodos de espectroscopia de masas, FTIR y espectroscopia Raman; en dicho trabajo se concluye que el método FTIR es un método barato que no requiere gran cantidad de muestra, dicho método nos brinda

información gracias a que identifica varias clases de biomoléculas, y su sensibilidad a los carbohidratos y lipopolisacáridos presentes en estructuras de membrana externa de bacterias gramnegativas, incluida *Klebsiella*, puede contribuir la base comparativa de su capacidad de discriminar cepas bacterianas. (Dieckmann *et al.*, 2016)

En 2018 se utilizó como base el conocimiento de que se puede identificar bacterias con FTIR y se modificó la técnica para sondear bacterias vivas mediante microscopía de fuerza atómica infrarrojo, se estudiaron las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, en este trabajo se logró no solo identificar a las cepas, si no también se detectó el grosor de su membrana externa y la viabilidad de las células (Kochan et al, 2018).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La mayoría de las infecciones nosocomiales son causadas por los microorganismos ESKAPE (*Enterobacter faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*), denominados así por su multirresistencia a antibióticos, estos tienen el potencial para escapar de las acciones de agentes antibacterianos.

El aumento de la resistencia microbiana a antibióticos se ha convertido en un riesgo a nivel mundial ya que su potencial impacto en la salud es tan significativo como el del calentamiento global; el desafío que este problema conllevó fue a crear una prueba de identificación bacteriana rentable, precisa, rápida y fácil de usar para infecciones bacterianas que permita a los profesionales de la salud de todo el mundo administrar los antibióticos correctos en el momento adecuado.

Dos aspectos claves en un método así es su habilidad para una correcta detección e identificación de una bacteria patógena, considerando su sensibilidad, especificidad, costo y tiempo de detección.

Una técnica ideal para lograr una rápida caracterización microbiana debería contemplar: a) mínima preparación de la muestra, b) análisis automático de gran cantidad de muestras en forma seriada, con bajo costo de reactivos, c) disponibilidad de una base de datos estable, de fácil empleo y operación en forma automatizada bajo el control por computadoras.

Eventualmente, los métodos multidisciplinarios, incluyendo materiales revolucionarios más sensibles, electrónica, grandes bases de datos, sistemas autónomos y supercomputación se combinarán para proporcionar soluciones de diagnóstico para la amenaza de salud más preocupante del futuro.

## **JUSTIFICACIÓN.**

La metodología actualmente utilizada en los laboratorios para la identificación bacteriana representa una inversión en tiempo y costo, algunas de estas metodologías requieren además de personal altamente capacitado dado que los equipos a utilizar son además complejos.

El presente trabajo tiene como finalidad brindar una herramienta más para la identificación rápida bacteriana, esta herramienta es un sensor óptico construido con una microcavidad de silicio poroso.

Una de las características importantes de los dispositivos utilizados como sensores es la sensibilidad, esta se define como el cociente entre el cambio que se produce en la señal del detector utilizado sobre el cambio en alguna propiedad que se mide. En el caso del sensor desarrollado, la sensibilidad se puede definir como el cambio de señal respecto del cambio en el índice de refracción efectivo en la multicapa del sensor.

No existe una base de datos relacionada a la identificación bacteriana aplicando la propiedad del índice de refracción para este propósito. Este método es fácil de usar, no requiere instrumentos muy costosos, es rápido y de fácil interpretación.

Un método que pueda identificar el agente causal bacteriano podría significar ventajas en términos de una terapia antibacteriana directa, sirve además para orientar al personal médico en su toma de decisiones con respecto al tratamiento, manejo y monitoreo de enfermedades de manera oportuna, tomando en cuenta que una rápida identificación de bacterias patógenas puede orientar al médico para un tratamiento más efectivo y directo contra las infecciones.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Estudio óptico mediante espectroscopia FT-IR y UV-Vis del sistema bacteria-semiconductor.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Preparación de cuatro muestras bacterianas, dos de tipo grampositivas y dos de tipo gramnegativas.
- Medición del sistema bacteria-Silicio cristalino mediante espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier.
- Elaboración del Reflector de Bragg mediante ataque electroquímico a un sustrato de Silicio cristalino, con un máximo de reflectancia en la región visible del espectro electromagnético.
- Medición del sistema Bacteria-Reflector de Bragg mediante espectroscopia Ultravioleta-visible (UV-Vis).
- Determinación del índice de refracción de cada bacteria mediante espectroscopia UV-Vis.

## DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

### Tipo de estudio.

Observacional, prospectivo, transversal y descriptivo.

### Universo del estudio.

El universo del estudio en este trabajo incluye:

- Cepas: *Staphylococcus aureus* (cepa 921), *Staphylococcus epidermidis* (cepa 735), *Pseudomonas aeruginosa* (cepa R04) y *Escherichia coli* (cepa E2348/69).
- Obtención del reflector de Bragg por ataque electroquímico de silicio cristalino.

### Tamaño de muestra.

Cuatro muestras bacterianas de: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* a una concentración de  $9 \times 10^8$  UFC/mL.

Cinco reflectores de Bragg obtenidos mediante ataque electroquímico de silicio cristalino.

### Sede y lugar del estudio.

Laboratorio de Microbiología y Laboratorio del Centro de Investigaciones en Dispositivos Semiconductores de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

### Criterios de selección.

Criterios de inclusión: Cepas pertenecientes al género y la especie de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*.

Obleas de silicio cristalino (Si-c) tipo p+ dopadas con Boro, orientación (100), resistividad 0.01-0.02  $\Omega$  cm.

Criterios de exclusión: Cepas contaminantes como hongos, levaduras u otras que no sean las de interés en este estudio.

Obleas de silicio cristalino tipo n con cualquier orientación cristalográfica.

**Recursos humanos.**

Director de tesis del área de Semiconductores (Dra. Fabiola Gabriela Nieto Caballero).

Director de tesis del área de Microbiología (Dra. Ana Marta de los Ángeles Lobo Sánchez).

Asesor externo para la parte de Semiconductores (Dr. Godofredo García Salgado).

Tesista: Lucy Abigail Cruz Cruz

**Recursos financieros.**

Recursos propios y apoyo de la infraestructura de Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ-BUAP), e infraestructura del Centro de Investigaciones en Dispositivos Semiconductores del Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla (CIDS-ICUAP, BUAP)

**Diseño estadístico.**

Estadística descriptiva.

## MATERIALES Y METODOLOGÍAS.

### Obtención de las bacterias.

Materiales:

- Placas con agar TSA (Agar Soya Trypticaseína) de 100x15 mm
- Autoclave
- Centrífuga
- Tubos de ensayo con solución salina isotónica.
- Tubos eppendorf (1.5 mL)
- Micropipeta (10 µl)

Cepas bacterianas:

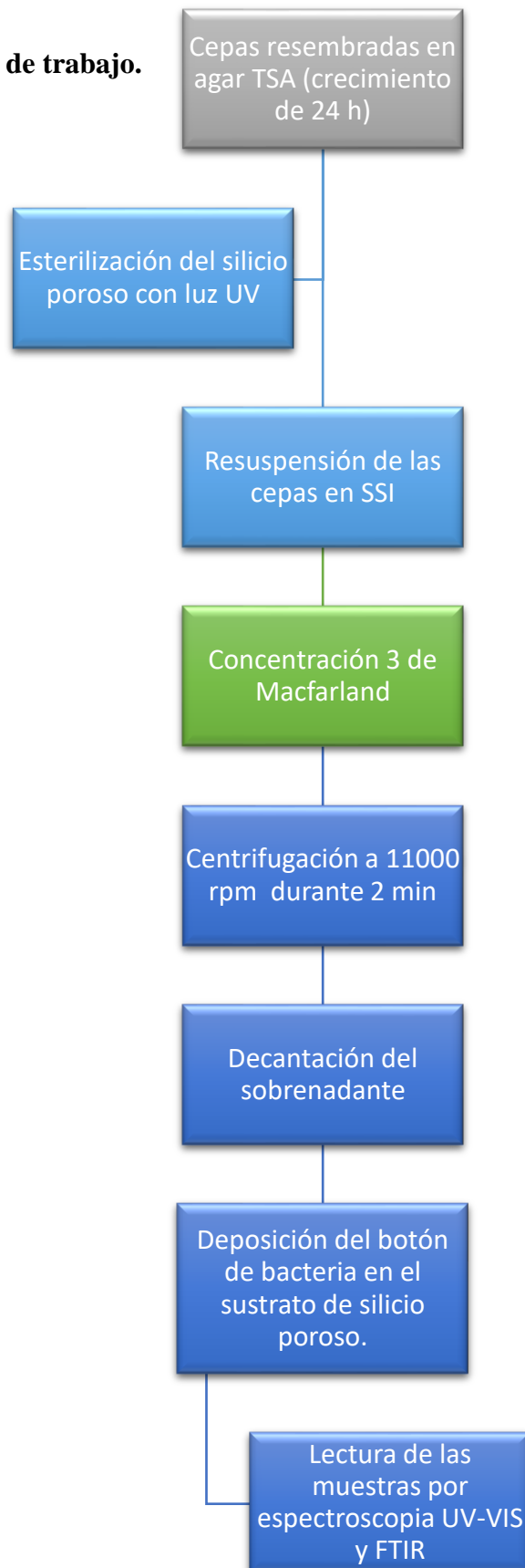
Las cepas bacterianas utilizadas en el ensayo fueron proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas BUAP: *Staphylococcus aureus* (cepa 921), *Staphylococcus epidermidis* (cepa 735), *Pseudomonas aeruginosa* (cepa R04) y *Escherichia coli* (cepa E2348/69).

Metodología.

- Paso 1: Se sembraron las cepas en TSA permitiendo un crecimiento de 24 h.
- Paso 2: Se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup> (permite elevar la temperatura de la autoclave a 121 °C) durante 15 min, los siguientes materiales: pinzas metálicas, cubreobjetos, cajas Petri de vidrio, solución salina isotónica (SSI), puntas azules y blancas para micropipetas.
- Paso 3: Se esterilizó con luz Ultravioleta: 5 cajas Petri de vidrio, 5 placas de silicio y 10 tubos eppendorf.
- Paso 4: Una vez la cepa tuvo un crecimiento de 24 h, se resuspendió muestra de cada cepa en un tubo de ensayo que contenía 1 mL de SSI, se igualó la concentración a 3 de la escala Mcfarland (concentración=  $9 \times 10^8$  UFC/mL), dicha suspensión se pasó a un tubo eppendorf; los tubos fueron rotulados y llevados a la microcentrífuga.

- Paso 5: Los 2 tubos eppendorf con la muestra se centrifugaron a una velocidad de 11000 rpm durante 2 min. Nota: Posterior a la centrifugación se observó la formación de un botón.
- Paso 6: Se decantó el sobrenadante, el botón se resuspendió en 2.5  $\mu\text{L}$  de SSI estéril, una vez resuspendido, se tomó una alícuota de 2.5  $\mu\text{L}$  y se colocó en el sustrato (Reflector de Bragg) estéril, con la misma punta de la micropipeta la gota se expandió haciendo un círculo, se dejó cerca del mechero esperando a que las bacterias se fijaran a la superficie.
- Paso 7: El sustrato con la bacteria se colocaron dentro de una caja de Petri estéril y se rotularon las muestras.
- Paso 8: Las muestras fueron leídas con FT-IR y UV-VIS en el laboratorio de semiconductores.

**Esquema general de trabajo.**



## **Obtención del reflector de Bragg.**

La obtención del silicio poroso se llevó a cabo por anodización electroquímica en obleas de silicio cristalino (Si-c) tipo p+ dopadas con Boro, orientación (100), resistividad 0.01-0.02  $\Omega$  cm, aplicando una densidad de corriente específica mediante una fuente de corriente programable Kithley bajo el control de una computadora sobre la parte pulida de la oblea dentro de una celda que contiene un electrolito acuoso.

La parte no pulida de la oblea de Si-c se utiliza como ánodo, el cual actúa como electrodo positivo de la celda, posicionado por encima del contacto posterior del aluminio, mientras que el cátodo es de tungsteno, elegido por ser un material resistente al ácido fluorhídrico, que actúa como electrodo negativo de la celda.

El electrolito empleado para la obtención de las capas de SP fue a base de ácido fluorhídrico (HF) concentrado al 40% y etanol al 99.6%. El etanol es adicionado para reducir la tensión superficial y permitir que la solución penetre perfectamente dentro de los poros.

Limpieza de la oblea de silicio cristalino.

Las obleas utilizadas vienen selladas y empacadas de fábrica, por lo que solo se necesita remover una capa de óxido nativo en la superficie.

- Paso 1: Se cortaron las obleas de 1.5 cm de largo y 1.5 cm de alto, para cubrir completamente el área de ataque de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de la celda para evitar la existencia de fuga del electrolito.
- Paso 2: Para eliminar el óxido nativo, la oblea de Si-c se colocó en un vaso de precipitado de plástico con HF y etanol en una relación de volumen 1:1 por 5 min.
- Paso 3: Se enjuagó la muestra con agua desionizada y se secó.
- Paso 4: Se colocó la muestra en la celda, se aseguró la celda para que quedara sellado, se le agregó el electrolito a base de HF y etanol en una relación de volumen 1:1.
- Paso 5: El cátodo de tungsteno se encuentra pegado a las paredes de la celda dentro de la solución, donde se colocó la punta negativa de la fuente y el ánodo de la celda es el Si-c-p+ que se encuentra haciendo contacto con el aluminio donde se colocó la punta positiva de la fuente, para así aplicar una corriente específica durante un tiempo determinado para cada muestra (gravimetría).

- Paso 6: Una vez terminado el proceso se retiró la solución.

En la Tabla 4, se indican los índices de refracción de las capas formadas de silicio poroso (n), el tiempo de proceso utilizado en la formación de estas (t), así como también el espesor (d), la densidad de corriente ( $\delta$ ) y el porcentaje de porosidad de cada capa (P).

La porosidad se estima por la siguiente ecuación:

$$P (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \times 100$$

En donde:

$m_1$  = Peso del silicio cristalino

$m_2$  = Peso del silicio poroso después de la anodización

$m_3$  = Peso del silicio poroso decapado.

El espesor de la capa, d, se calcula por la siguiente expresión:

$$d = \frac{m_1 - m_3}{S \times \rho}$$

En donde:

$\rho$  = densidad del silicio

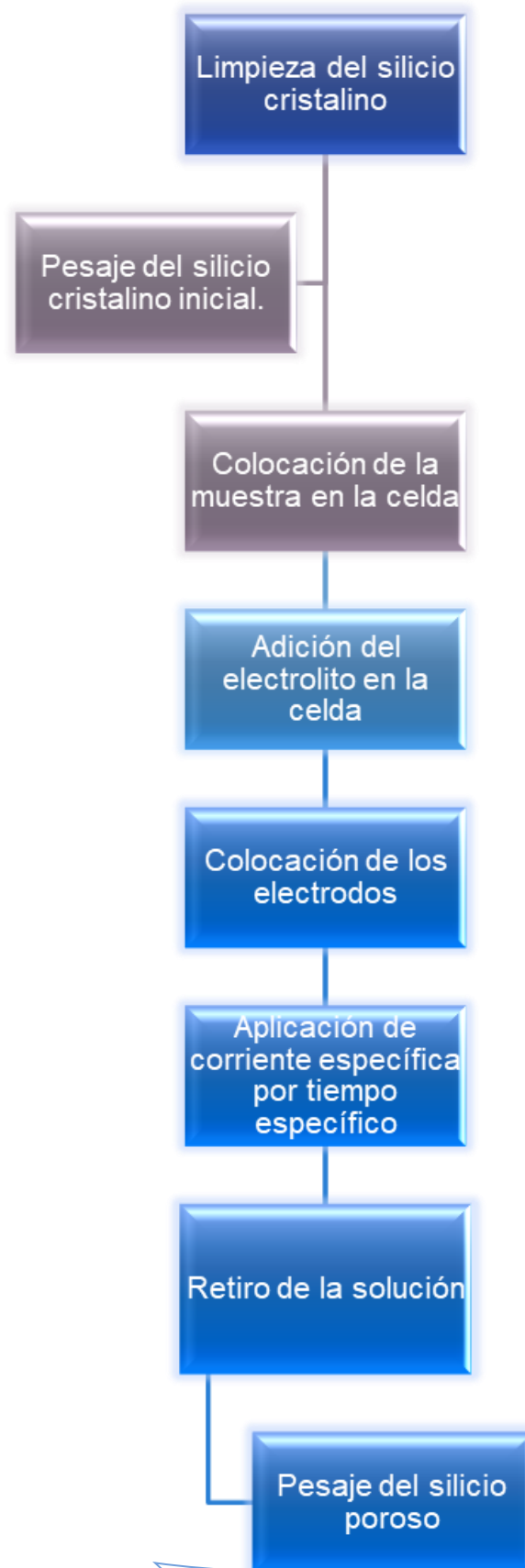
S= área de ataque

El silicio poroso ya ha sido previamente caracterizado con las densidades de corriente empleadas en la anodización (Anexo A).

Tabla 4. Parámetros utilizados para el diseño del Reflector de Bragg.

RBD <b>15 periodos (30 capas)</b>	n	t (seg)	d (nm)	<i>i</i> (mA)	P (%)
<b>A</b>	3.47	1.1	30.2	5	39
<b>B</b>	1.62	4.1	64.6	80	74

**Esquema general de trabajo.**



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Espectroscopia IR

Los espectros FTIR obtenidos de células bacterianas se pueden utilizar para analizar su composición molecular que varía de una especie a otra, e incluso a niveles de tensión. Por lo tanto, cada bacteria tendrá un espectro único y característico.

Las características de la superficie celular varían entre las bacterias grampositivas y gramnegativas. Las bacterias grampositivas tienen una capa más gruesa y rígida de peptidoglicano (PG, 40-80% en peso de la pared celular) que las bacterias gramnegativas (10% en peso de la pared celular). En la estructura primaria se tienen cadenas de polisacáridos paralelos de ácido N-acetilglucosano (NAG) y ácido N-acetilminémico (NAM) unidos por enlaces glucosídicos. Las cadenas paralelas están unidas por penta o tetrapéptidos. La composición de aminoácidos de las cadenas de péptidos penta o tetra varía en diferentes especies de bacterias.

Las paredes celulares grampositivas también contienen ácidos teicoicos que se unen covalentemente al PG, las células gramnegativas no contienen ácidos teicoicos, pero tienen lipoproteínas unidas covalentemente al PG en las paredes celulares. Las bacterias gramnegativas tienen una membrana externa fuera de la capa PG que contiene fosfolípidos en la capa interna y lipopolisacáridos en la capa externa (Davis y Mauer, 2010).

Se consideran cinco regiones de absorbancia en los espectros IR para la identificación de bacterias: la región espectral de  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  es la región de ácidos grasos (región I);  $1700-1500\text{ cm}^{-1}$  contiene las bandas de proteínas y péptidos (región II);  $1500-1200\text{ cm}^{-1}$  es una región de vibraciones de flexión de ácidos grasos, proteínas y compuestos de fosfato (región III);  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  contiene bandas de absorción de los carbohidratos en paredes celulares microbianas (región IV); y  $900-700\text{ cm}^{-1}$  es la "región de huellas dactilares" que contiene absorbancias débiles pero características de cada bacteria (región V) (Davis y Mauer, 2010).

En la Figura 16 se muestran los espectros IR obtenidos de las muestras y podemos observar que en general tiene un comportamiento similar con ligeras diferencias en cuanto a la intensidad de los picos de absorción. En donde se observa diferencias significativas es

aproximadamente de 400 a 900  $\text{cm}^{-1}$ , que es asignada como “huella dactilar” de cada bacteria. La banda ancha centrada en 3300  $\text{cm}^{-1}$  está asignada a la vibración de estiramiento del enlace N-H de amidas A en proteínas, en 2925  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento asimétrico del enlace C-H del grupo  $\text{CH}_3$  en ácidos grasos, en 2870  $\text{cm}^{-1}$  se asocia a la vibración de estiramiento simétrico del enlace C-H en ácidos grasos. El pico localizado en 1650  $\text{cm}^{-1}$  es asignado a Amidas I de proteínas con estructura  $\alpha$ -hélice, enlace de tipo N-H con movimiento de flexión. En 1550  $\text{cm}^{-1}$  es asignada a vibraciones de amidas II en proteínas (enlace N-H), en 1450  $\text{cm}^{-1}$  es asignada la vibración de deformación del enlace C-H del grupo  $-\text{CH}_2-$  en lipoproteínas. En 1400  $\text{cm}^{-1}$  se asocia la vibración de estiramiento simétrico del enlace C=O del grupo  $\text{COO}^-$  de aminoácidos y en ácidos grasos. En 1310-1240  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a vibraciones de amidas III componentes de proteína. En 1240-1230  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a vibraciones de estiramiento asimétrico de P=O en enlaces de tipo fosfodiésteres en fosfolípidos y la vibración en 1080  $\text{cm}^{-1}$  es asociada a vibración de estiramiento simétrico del enlace P=O en fosfolípidos, DNA y RNA (Tabla 5). Y en la figura 17 se muestran los tipos de vibración de una molécula de agua.

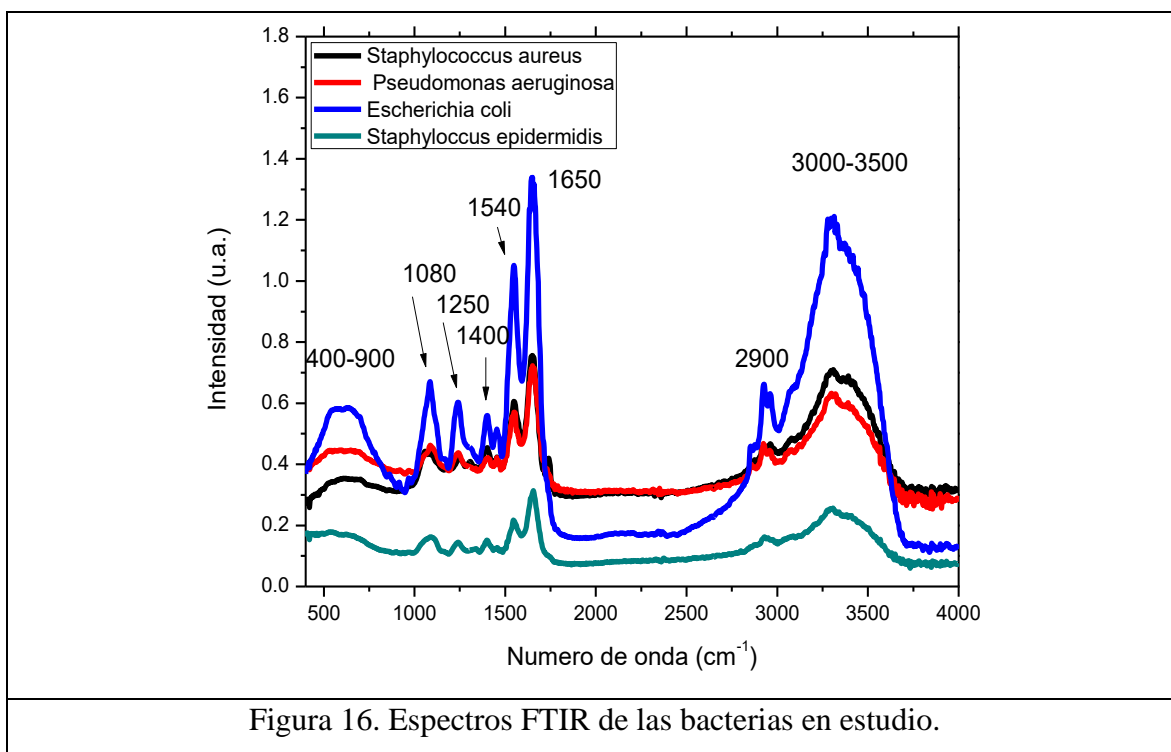
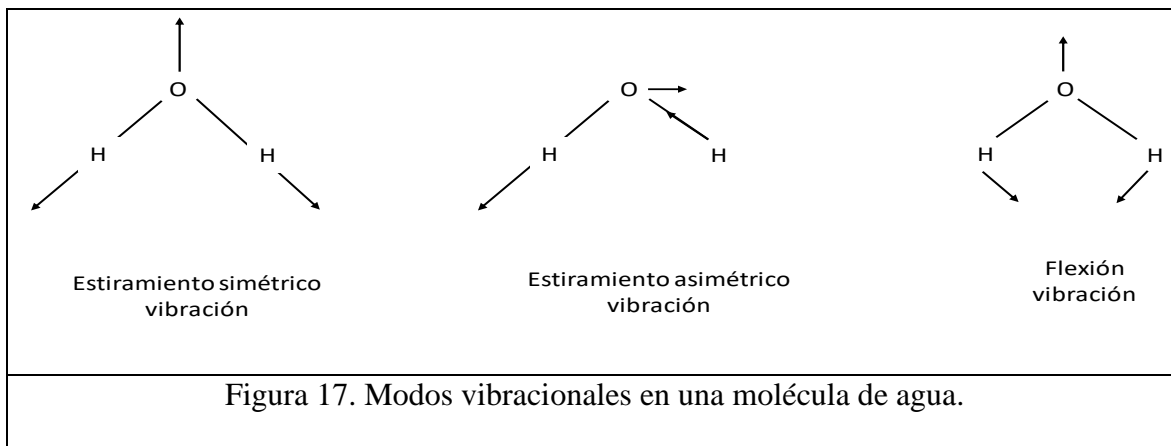


Figura 16. Espectros FTIR de las bacterias en estudio.

Tabla 5. Contribuciones vibracionales de los grupos funcionales.

<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tipo de enlace</b>	<b>Vibración molecular</b>	<b>Grupo funcional</b>
<b>3300</b>	N-H	Estiramiento	Amida A (proteínas)
<b>2925</b>	C-H	Estiramiento asimétrico	Metileno (Ácidos grasos)
<b>2870</b>	C-H	Estiramiento simétrico	Metilo (Ácidos grasos)
<b>1660</b>	C=O	Estiramiento simétrico	Amida primaria (proteínas)
<b>1650</b>	N-H	Flexión	
<b>1550</b>	N-H	Estiramiento	Amida secundaria (proteínas)
<b>1450</b>	C-H	Deformación flexión	Metileno (lipoproteínas)
<b>1400</b>	C=O	Estiramiento simétrico	Ácido carboxílico (aminoácidos y ácidos grasos)
<b>1310-1240</b>	N-H	Flexión	Amida terciaria (proteínas)
<b>1240-1230</b>	P=O	Estiramiento asimétrico	Fosfato (Fosfolípidos)
<b>1080</b>	P=O	Estiramiento simétrico	Fosfato (Fosfolípidos, DNA, ARN)
<b>900 - 400</b>	Huella dactilar	---	---



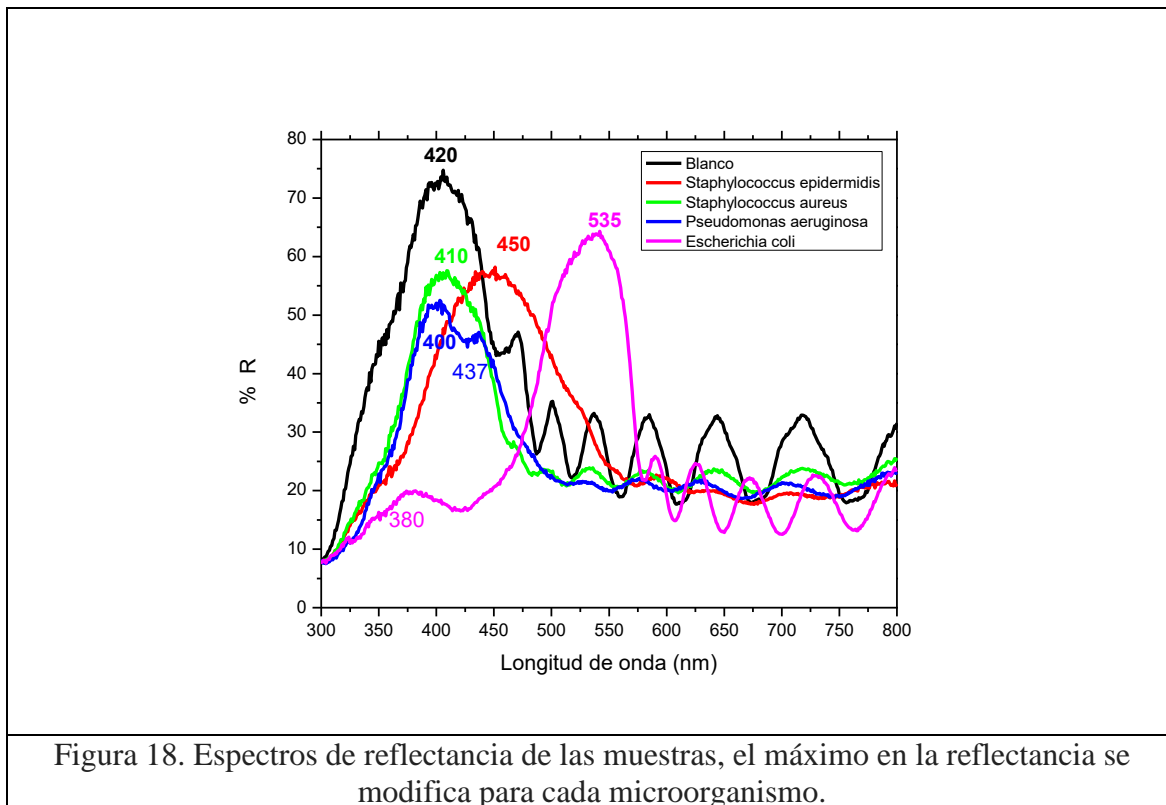
De acuerdo con el estudio realizado por Nieto en 2004, la espectroscopia FTIR es una herramienta con la cual se puede clasificar microorganismos en diferentes niveles taxonómicos sin la necesidad de una selección previa por otros criterios, con los resultados obtenidos en el presente trabajo con esta técnica observamos que los espectros coinciden con lo reportado por otros grupos de investigación, de esta forma corroboramos el alcance de la técnica aplicada a la microbiología, se observa que en efecto las diferencias de cada bacteria se encuentran en la región de bajos números de onda, donde esta etiquetada como huella dactilar (Nieto *et al*, 2004).

En la región de  $900$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , se muestran claras diferencias en los espectros obtenidos de las muestras, se reporta en la literatura el tratamiento matemático de los datos y la transformación con la primera y segunda derivada que generalmente se usa para clasificación taxonómica de las bacterias.

Una contribución importante de este trabajo es el uso del silicio cristalino como soporte para la lectura de las muestras en FTIR para la obtención de los espectros, recordemos que para realizar una lectura con espectroscopía FTIR se necesita un componente transparente a la radiación IR, lo que significa que no debe dar señal al momento de la lectura, y para esto la molécula del componente no debe de ser polar; un enlace no polar, en una molécula simétrica tendrá poca o ninguna absorptividad y una molécula homonuclear diatómica no será activa en el FTIR; el silicio cristalino transmite más del 95% de las longitudes de onda de la radiación infrarroja, es también un material biodegradable y se pueden modificar sus características para aumentar su biocompatibilidad, además de ser un material reutilizable con la correcta limpieza del material.

## Espectroscopia UV- Visible.

En la Figura 18, se muestran los espectros UV-Vis obtenidos de las muestras, se observa que la muestra sin bacteria presenta un máximo en la reflectancia en 420 nm.



En los espectros obtenidos de las muestras, en general presentan un corrimiento del máximo hacia longitudes de onda altas con la presencia de las bacterias. En el espectro de las bacterias grampositivas se observa una banda ancha de reflexión de intensidad similar y el máximo entre ellas presenta una diferencia de 40 nm. A diferencia, en los espectros que corresponden a las bacterias gramnegativas presentan dos bandas, el correspondiente a la muestra de *Pseudomonas aeruginosa* el máximo de la banda de reflexión de mayor intensidad se localiza en aproximadamente 400 nm y la otra en 437 nm. En el espectro que corresponde a la muestra de *Escherichia coli* el máximo se presenta en 535 nm y la banda de menor intensidad en 380 nm.

El silicio poroso (PS) es un material nanoestructurado ampliamente utilizado para preparar cristales fotónicos debido a la facilidad de afinar su porosidad y su índice de

refracción cambiando las condiciones de fabricación. Hay dos propiedades físicas necesarias para fabricar estructuras fotónicas: la calidad de la periodicidad de espesor y el índice de refracción de sus componentes. Dado que la morfología de PS cambia con la porosidad, la determinación del índice de refracción de PS no es tarea fácil. Para encontrar las propiedades ópticas de PS podemos utilizar la aproximación de medios efectivos (EMA). En este trabajo se utilizó un método para evaluar el índice de refracción de las bacterias utilizando un reflector de Bragg y la ecuación de Bruggeman. El reflector de Bragg obtenido del ataque electroquímico del silicio cristalino funciona como un sensor para la detección de bacterias.

En los resultados obtenidos con este dispositivo, se observa un cambio significativo en el máximo de reflexión diferenciando la presencia de cada bacteria. El sistema presenta una alta sensibilidad sin la necesidad de funcionalizar la superficie con otras sustancias orgánicas como se reporta en la literatura. (Recio *et al*, 2011)

Las propiedades ópticas de la capa de silicio poroso se describen como una mezcla de aire, silicio y dióxido de silicio que están determinadas por el grosor, la porosidad, el índice de refracción y la forma y el tamaño de los poros. Estos parámetros son considerados en los diferentes métodos propuestos como el de Maxwell-Garnett, Looyenga o Bruggeman.

El modelo que se utiliza para el estudio del sistema “bacteria-reflector de Bragg” es la aproximación de Bruggeman, se considera un sistema de dos medios que está representada por la ecuación Ec-1:

$$(1 - P) \left( \frac{n_{Si-c}^2 - n_{P-Si}^2}{n_{Si-c}^2 + 2n_{P-Si}^2} \right) + P \left( \frac{n_a^2 - n_{P-Si}^2}{n_a^2 + 2n_{P-Si}^2} \right) = 0 \quad \text{Ec.1}$$

Donde P es la porosidad,  $n_a^2$  es el índice de refracción del aire,  $n_{Si-c}^2$  es el índice de refracción del Silicio cristalino,  $n_{P-Si}^2$  es el índice de refracción del Silicio poroso (Sohn, 2014).

El índice de refracción del Silicio poroso puede ser calculado por la ecuación Ec-2:

$$n_{P-Si}^2 = \frac{1}{4} \left[ 3P(n_a^2 - n_{Si-c}^2) + 2n_{Si-c}^2 - n_a^2 + \sqrt{(3P(n_a^2 - n_{Si-c}^2) + 2n_{Si-c}^2 - n_a^2)^2 + 8n_a^2 n_{Si-c}^2} \right] \quad \text{Ec.2}$$

El valor del índice de refracción del silicio poroso obtenido es de  $n_{P-Si} = 3.49315$

Con este parámetro, se utilizó nuevamente la ecuación de Bruggeman para determinar el índice de refracción de cada bacteria (Ec.3).

$$(1 - P) \left( \frac{n_{Si-c}^2 - n_{ef}^2}{n_{Si-c}^2 + 2n_{ef}^2} \right) + P \left( \frac{n_{Bac}^2 - n_{ef}^2}{n_{Bac}^2 + 2n_{ef}^2} \right) = 0 \quad \text{Ec.3}$$

En donde:

$P$ : es la porosidad de la capa seleccionada

$n_{Bac}$  : es el índice de refracción de la bacteria a determinar.

$n_{Si-c}$  : es el índice de refracción del silicio cristalino (Anexo B)

$n_{ef}$  : es el índice de refracción efectivo que corresponde al sistema bacteria-Silicio cristalino, este dato se obtiene de la relación del espesor óptico  $d$  , en donde cada capa debe ser igual a  $\frac{1}{4}$  de la longitud de onda que se desea reflejar.

$$n_{ef} = \frac{\lambda_0}{4d} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

$\lambda_0$  -longitud de onda (máximo de reflectancia de cada bacteria).

Con la ecuación Ec.4, podemos calcular el índice de refracción de cada bacteria

$$n_{Bac}^2 = \left[ \frac{[(-2 * n_{Si-c}^2 * n_{ef}^2) + (2 * n_{ef}^4) + (3 * P * n_{Si-c}^2 * n_{ef}^2) + (2 * P * n_{ef}^4)]}{[n_{Si-c}^2 - n_{ef}^2 + (3 * P * n_{ef}^2)]} \right] \quad \text{Ec.5}$$

El Reflector de Bragg fue diseñado para su respuesta a una longitud de onda de 420 nm con 30 capas de silicio poroso, las densidades de corriente utilizadas fueron de 5 mA (bajas porosidades) y 80 mA (altas porosidades).

Para la determinación del índice de refracción de cada bacteria se trabajó en una hoja de cálculo con el programa Excel (Figura 19) con los datos que se presentan en la Tabla 6, así como el valor del índice de refracción obtenido.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	<b>Staphylococcus aureus</b>							
2	Longitud de onda (nm)	410						
3	porosidad (P)	0.39						
4	Espesor (d) (nm)	30.2						
5	n si-c (410 nm)	5.332		A= n2 Si-c	28.430224		A	0.3285597
6	n ef= lamda/4d	3.3940397		B= n2 ef	11.519506		(1-P)	0.61
7				2* n2 ef	23.039011			
8							(1-P)*A	0.2004214
9				$B^2=(n2\ ef)^2$	132.69901			
10								
11		P* n2 ef	4.4926072					
12					C	3.1945098		
13			4.6175118		Raiz de C	1.7873192		
14				<b>Indice de Refracción =</b>		<b>1.787</b>		

(a)

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	<b>Pseudomonas aeruginosa (436 nm)</b>							
2	Longitud de onda (nm)	436						
3	porosidad (P)	0.39						
4	Espesor (d) (nm)	30.2						
5	n si-c (436 nm)	4.865		A= n2 Si-c	23.668225		A	0.21401802
6	n ef= lamda/4d	3.60927152		B= n2 ef	13.0268409		(1-P)	0.61
7				2* n2 ef	26.0536819			
8							(1-P)*A	0.13055099
9				$B^2=(n2\ ef)^2$	169.698585			
10								
11		P* n2 ef	5.08046796					
12					C	8.33969809		
13			3.40133402		Raiz de C	2.88785354		
14				<b>Indice de Refracción =</b>		<b>2.8878535</b>		
15								

(b)

	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	<b>Staphylococcus epidermidis (449 nm)</b>								
2	Longitud de onda (nm)	449							
3	porosidad (P)	0.39							
4	Espesor (d) (nm)	30.2							
5	n si-c (449 nm)	4.705		A= n2 Si-c	22.137025		A	0.1672129	
6	n ef= lamda/4d	3.7168874		B= n2 ef	13.815252		(1-P)	0.61	
7				2* n2 ef	27.630504				
8							(1-P)*A	0.1019999	
9				B <sup>2</sup> =(n2 ef) <sup>2</sup>	190.86119				
10									
11		P* n2 ef	5.3879483						
12					C	11.302814			
13			2.8183078		Raiz de C	3.3619658			
14				<b>Indice de Refracción =</b>		<b>3.3619658</b>			
15									
16									
17									
18									

(c)

	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	<b>Escherichia coli (534nm)</b>								
2	Longitud de onda (nm)	534							
3	porosidad (P)	0.39							
4	Espesor (d) (nm)	30.2							
5	n si-c (534 nm)	4.133		A= n2 Si-c	17.081689		A	-0.0437896	
6	n ef= lamda/4d	4.4205298		B= n2 ef	19.541084		(1-P)	0.61	
7				2* n2 ef	39.082167				
8							(1-P)*A	-0.0267117	
9				B <sup>2</sup> =(n2 ef) <sup>2</sup>	381.85395				
10									
11		P* n2 ef	7.6210227						
12					C	38.449174			
13			-1.0439502		Raiz de C	6.2007398			
14				<b>Indice de Refracción =</b>		<b>6.2007398</b>			
15									
16									

(d)

Figura 19. Hoja de calculo de Excel para la obtención del índice de refracción de las bacterias (a-d) utilizando la ecuación de Bruggeman.

En la tabla 6, se pueden observar los datos utilizados para la determinación del índice de refracción de cada bacteria, en la primer columna se muestran los nombres de las bacterias a analizar, la segunda columna muestra la porosidad de las capas de silicio poroso utilizada en la ecuación de Bruggeman, la tercera columna corresponde a los datos de longitud de onda obtenidos del espectro de reflectancia de cada bacteria, la cuarta columna indica el índice de refracción del silicio cristalino ( $n_{Si-c}$ ) el cual se determinó a partir del “Anexo B” dado que este parámetro se ve modificado en función de la longitud de onda que interactúa con el sistema. La columna que indica el valor del índice de refracción efectivo ( $n_{ef}$ ) corresponde al sistema “bacteria-Silicio cristalino”, la cual se obtiene de la relación del espesor óptico  $d$  (Ec. 4), en donde cada capa debe ser igual a  $\frac{1}{4}$  de la longitud de onda que se desea reflejar. La última columna muestra el índice de refracción ( $n_{Bacteria}$ ) determinado con la hoja de cálculo Excel, a partir de todos los parámetros considerados en la ecuación de Bruggeman. Como se puede observar no existe un patrón que relacione entre si a cada bacteria, lo que representa una ventaja en el propósito de diferenciar a cada bacteria, en este caso mediante un parámetro físico como lo es la interacción de la luz con el sistema en estudio.

Tabla 6. Índice de refracción de las bacterias, obtenido de la ecuación de Bruggeman.

<b>Bacteria</b>	<b>Porcentaje de Porosidad (%)</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b><math>n_{Si-c}</math> (Anexo B)</b>	<b><math>n_{ef}</math></b>	<b><math>n_{Bacteria}</math></b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.39	410	5.332	3.394	1.787
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.39	436	4.865	3.609	2.887
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.39	449	4.705	3.716	3.361
<i>Escherichia coli</i>	0.39	535	4.133	4.420	6.200

Una característica importante de los dispositivos utilizados como sensores es la sensibilidad, ésta se define como el cociente entre el cambio que se produce en la señal del detector utilizado sobre el cambio en alguna propiedad que se mide (Wakaki y Kudo, 2007). En el caso de un sensor óptico construido con una microcavidad de SP (RBD), la sensibilidad se puede definir como el cambio de señal respecto del cambio en el índice de refracción efectivo en la multicapa. Puede observarse que toda la estructura del espectro de reflexión (Figura 18) se ve desplazado hacia mayores longitudes de onda como consecuencia del aumento del índice de refracción efectivo, desde la condición inicial de no funcionalizada a la condición final de funcionalizada. El aumento se debe a que el material dentro de los poros —originalmente aire— se reemplaza por otro con mayor índice de refracción, y como consecuencia el índice de toda la nanoestructura.

Otra característica de gran relevancia para un sensor es la selectividad, esta puede lograrse modificando la superficie del SP incluyendo en las paredes de los poros moléculas que terminen en radicales específicos (Baaser, 2010), lo que podría estar relacionado con la estructura química de cada bacteria.

Finalmente cabe mencionar que la finalidad de este trabajo no es sustituir alguna de las técnicas de identificación bacteriana ya existente, si no aportar más información sobre características físicas de las bacterias como lo es el índice de refracción e implementar el silicio cristalino y poroso para las técnicas de identificación con FTIR y UV-Vis.

## CONCLUSIONES

- Se analizaron las bacterias en estudio por medio de espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier obteniendo cuatro espectros perfectamente diferenciados de cada bacteria en bajos números de onda. La contribución de este trabajo para el uso de esta técnica es la implementación del silicio cristalino como soporte evitando el uso de sustancias como KBr (Bromuro de potasio) para de esta forma evitar contribuir a la contaminación ambiental.
- Se elaboró a partir del semiconductor de Silicio cristalino tipo p+, un reflector de Bragg para el estudio del sistema Bacteria-Reflector de Bragg con un máximo de reflectancia centrado en 420 nm aproximadamente.
- Se determinó el índice de refracción de cada bacteria en estudio, mediante la aproximación de Bruggeman para dos medios.
- El uso de este dispositivo óptico en conjunto con la espectroscopia UV-Vis representa una herramienta para la posible identificación de bacterias mediante la determinación del índice de refracción, siendo un método sencillo y de bajo costo que se puede utilizar en laboratorios de análisis microbiológicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- Acquaroli, L. N. (2012). Propiedades ópticas de silicio poroso nanoestructurado (Doctoral dissertation).
- 2.- Aguilar-Zapata, D. (2016). *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Médica Sur*, 22(2), 57-63.
- 3.- Alvarenga, B., & Máximo, A. (2002). Física General con experimentos sencillos.
- 4.- Baaser, H. (2010). Development and Application of the Finite Element Method based on MatLab. Springer Science & Business Media.
- 5.- Brooks, G. F., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2000). Microbiología médica. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Microbiología médica. 21ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 142-3.
- 6.- Cartesa, P., & Pereira, J. C. (2016). Emulsions as templates agents using in elaboration of porous materials. *Revista Ingenieria UC*, 23(3), 308-318.
- 7.- Contreras, A. G. (2018). Silicio Poroso: Desde su producción hasta su aplicación como sistema de liberación controlada de Fármacos. *Naturaleza y Tecnología*, (16).
- 8.- Cubas, J. M., Pimentel, R. G. C., Merlín, I. E. M., & Martínez, E. S. M. (2018). La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama. *Latin-American Journal of Physics Education*, 12(2), 7.
- 9.- Davis, R., & Mauer, L. J. (2010). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 2, 1582-1594.
- 10.- Dieckmann, R., Hammerl, J. A., Hahmann, H., Wicke, A., Kleta, S., Dabrowski, P. W., ... & Lasch, P. (2016). Rapid characterisation of *Klebsiella oxytoca* isolates from contaminated liquid hand soap using mass spectrometry, FTIR and Raman spectroscopy. *Faraday discussions*, 187, 353-375.
- 11.- González, G. (1997). Series de Fourier, transformadas de Fourier y aplicaciones. *Divulgaciones matemáticas*, 5(1/2), 43-60.

- 12.- Grewal, M. K., Jaiswal, P., & Jha, S. N. (2015). Detection of poultry meat specific bacteria using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Journal of food science and technology*, 52(6), 3859-3869.
- 13.- Henao, L. A. O., Hernández, D. C., & Castaño, L. M. (2017). *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva: Estado portador en manipuladores de alimentos del SENA Regional Caldas en Manizales. *Revista Nova*, 3, 20-29.
- 14.- Hilario, C. B. C., & Vílchez, J. J. C. (2018). Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del látex de *Croton lechleri* “sangre de grado” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *CONOCIMIENTO PARA EL DESARROLLO*, 9(1), 129-136.
- 15.- Jaureguiberry, M., Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Drillich, M., & de la Sota, R. L. (2016). Espectrofotometría infrarroja transformada de Fourier para identificar bacterias uterinas patógenas en vacas lecheras. *Rev. Vet.* 27(2), 75-79
- 16.- Kane, J. W., & Sternheim, M. M. (1989). Editorial Reverté. SA Física.
- 17.- Kochan, K., Perez-Guaita, D., Pissang, J., Jiang, J. H., Peleg, A. Y., McNaughton, D., ... & Wood, B. R. (2018). In vivo atomic force microscopy–infrared spectroscopy of bacteria. *Journal of The Royal Society Interface*, 15(140), 20180115.
- 18.- Lamprell, H., Mazerolles, G., Kodjo, A., Chamba, J. F., Noel, Y., & Beuvier, E. (2006). Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from different species of *Staphylococcus* using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *International journal of food microbiology*, 108(1), 125-129.
- 19.- Macedo, M., & Mateos, S. (2006). Temas de bacteriología y virología médica. Universidad de la República Facultad de Medicina.
- 20.- Méndez-Vilas, A. (2010). Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology.
- 21.- Merrill, W., Díaz, R., Lore, M., Squires, M & Alexopoulos, N. (1999). Effective Medium Theories for Artificial Materials Composed of Multiple Sizes of Spherical Inclusions in a Host Continuum. *IEEE Transactions on antennas and propagation*, 47(1).

- 22.- Nieto, L. I., Donolo, A. S., Bava, A. J., & Yantorno, O. M. (2004). Empleo de espectroscopia infrarroja-transformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 38(3), 289-295.
- 23.- Pavesi, L., Mazzoleni, C., Guardini, R., Cazzanelli, M., Pelligrini V. & Tredicucci, A. (1996). Porous-silicon microcavities. *IL new trial*, (18).
- 24.- Prat, L., Calderer, J. (2010). Dispositivos electrónicos y fotónicos. Catalunya: EDICIONS UPC
- 25.- Recio-Sanchez, G., Dominguez-Cañizares, G., Manso, M., Preda, I., Torres-Costa, V., Gutierrez, A. & J Martin-Palma, R. (2011). Surface functionalization of nanostructured porous silicon by APTS: toward the fabrication of electrical biosensors of bacterium *Escherichia coli*. *Current Nanoscience*, 7(2), 178-182.
- 26.- Roca, D. Á. L. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 48(4), 465-474.
- 27.- Sandoval, A. P. (2015). Reacciones Electroquímicas Modelo en la Interfaz Líquido Iónico-Electrodo Monocristalino de Platino. España: Universidad Nacional de Colombia.
- 28.- Sohn, H. (2014). Refractive index of porous silicon. *Handbook of Porous Silicon*, 231-243.
- 29.- Spohr, M., Rau, J., Friedrich, A., Klittich, G., Fetsch, A., Guerra, B. & Tenhagen, B. A. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. *Zoonoses and Public Health*, 58(4), 252-261.
- 30.- Torres, J. (2014). Semiconductores: Tipos, aplicaciones y ejemplos. Recuperado el 03 de marzo de 2019 de <https://www.lifeder.com/semiconductores/>
- 31.- Tubón, U., & David, C. (2017). Determinación de bacteria *Pseudomona aeruginosa* en el área de hospitalización varones y mujeres, del hospital general docente Ambato y su relación con infecciones nosocomiales (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato-Facultad de Ciencias de la Salud-Carrera de Laboratorio Clínico).

32.- Wakaki, M., Shibuya, T., & Kudo, K. (2018). Physical properties and data of optical materials. CRC press.

33.- Weiss, S. (2005). Tunable porous silicon photonic bandgap structures: Mirrors for optical interconnects and optical switching.

34.- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista Biomédica, 25(3), 129-143.

## ANEXO A

Silicio tipo p+ dopadas con boro, con una resistividad de 0.01-0.02  $\Omega$ -cm, orientación (100), con una relación 1:1 en volumen para un electrolito de HF:etanol.

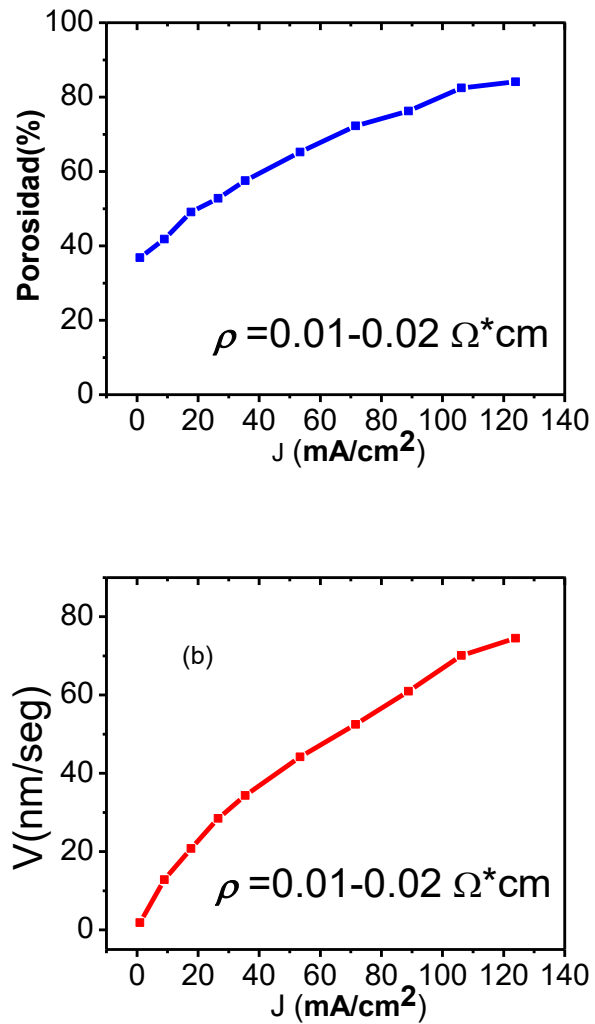


Figura 5.1. (a) Porosidad y (b) Velocidad de ataque vs densidad de corriente para HF: etanol.

## ANEXO B

### Propiedades ópticas del silicio

E(eV)	$\lambda$	$E_1$	$E_2$	n	$\kappa$	$\alpha(\text{cm}^{-1})$	$R_{(600)}$	$T_{(600)}$
0.000	-	11.69640	0.00000	3.420	0.000	0.00E+00	46.00%	53.44%
0.020	61.982	11.69298	0.00000	3.419	0.000	0.00E+00	45.98%	53.45%
0.040	30.991	11.69640	0.00000	3.420	0.000	0.00E+00	46.00%	53.44%
0.060	20.661	11.69913	0.00171	3.420	0.000	1.52E+00	43.14%	48.11%
0.080	15.496	11.70119	0.00109	3.421	0.000	1.30E+00	43.53%	48.83%
0.100	12.396	11.70324	0.00116	3.421	0.000	1.72E+00	42.82%	47.44%
0.120	10.330	11.70597	0.00068	3.421	0.000	1.22E+00	43.67%	49.10%
0.140	8.855	11.70940	0.00048	3.422	0.000	9.94E-01	44.09%	49.85%
0.160	7.748	11.71350	0.00016	3.422	0.000	3.73E-01	45.27%	52.04%
0.180	6.887	11.71830	0.00015	3.423	0.000	4.01E-01	45.22%	51.93%
0.200	6.198	11.72309	0.00001	3.424	0.000	1.50E-02	46.02%	53.33%
0.220	5.635	11.72103	0.00000	3.424	0.000	0.00E+00	46.05%	53.38%
0.240	5.165	11.72691	0.00000	3.424	0.000	0.00E+00	46.05%	53.38%
0.260	4.768	11.73330	0.00000	3.425	0.000	0.00E+00	46.06%	53.37%
0.280	4.427	11.74021	0.00000	3.426	0.000	0.00E+00	46.07%	53.36%
0.300	4.132	11.74765	0.00000	3.427	0.000	0.00E+00	46.09%	53.34%
0.320	3.874	11.75561	0.00000	3.429	0.000	0.00E+00	46.11%	53.31%
0.340	3.646	11.76411	0.00000	3.430	0.000	0.00E+00	46.13%	53.30%
0.360	3.443	11.77313	0.00000	3.431	0.000	0.00E+00	46.14%	53.29%
0.380	3.262	11.78269	0.00000	3.433	0.000	0.00E+00	46.17%	53.26%
0.400	3.099	11.79279	0.00000	3.434	0.000	0.00E+00	46.18%	53.25%
0.420	2.952	11.80343	0.00000	3.436	0.000	0.00E+00	46.20%	53.22%
0.440	2.817	11.81462	0.00000	3.437	0.000	0.00E+00	46.22%	53.20%
0.460	2.695	11.82636	0.00000	3.439	0.000	0.00E+00	46.24%	53.18%
0.480	2.583	11.83865	0.00000	3.441	0.000	0.00E+00	46.27%	53.15%
0.500	2.479	11.85150	0.00000	3.443	0.000	0.00E+00	46.29%	53.12%
0.520	2.384	11.86491	0.00000	3.445	0.000	0.00E+00	46.32%	53.09%
0.540	2.296	11.87889	0.00000	3.447	0.000	0.00E+00	46.35%	53.07%
0.560	2.214	11.89344	0.00000	3.449	0.000	0.00E+00	46.37%	53.04%
0.580	2.137	11.90857	0.00000	3.451	0.000	0.00E+00	46.40%	53.01%
0.600	2.066	11.92429	0.00000	3.453	0.000	0.00E+00	46.42%	52.99%
0.620	1.999	11.94059	0.00000	3.456	0.000	0.00E+00	46.46%	52.94%
0.640	1.937	11.95750	0.00000	3.458	0.000	0.00E+00	46.49%	52.92%
0.660	1.878	11.97500	0.00000	3.460	0.000	0.00E+00	46.51%	52.89%
0.680	1.823	11.99311	0.00000	3.463	0.000	0.00E+00	46.55%	52.85%
0.700	1.771	12.01185	0.00000	3.466	0.000	0.00E+00	46.59%	52.81%
0.720	1.722	12.03120	0.00000	3.469	0.000	0.00E+00	46.63%	52.77%
0.740	1.675	12.05119	0.00000	3.471	0.000	0.00E+00	46.65%	52.74%

0.760	1.631	12.07181	0.00000	3.474	0.000	0.00E+00	46.69%	52.70%
0.780	1.589	12.09308	0.00000	3.478	0.000	0.00E+00	46.74%	52.65%
0.800	1.550	12.11502	0.00000	3.481	0.000	0.00E+00	46.78%	52.61%
0.820	1.512	12.13761	0.00000	3.484	0.000	0.00E+00	46.82%	52.57%
0.840	1.476	12.16089	0.00000	3.487	0.000	0.00E+00	46.86%	52.53%
0.860	1.441	12.18484	0.00000	3.491	0.000	0.00E+00	46.91%	52.47%
0.880	1.409	12.20950	0.00000	3.494	0.000	0.00E+00	46.95%	52.43%
0.900	1.377	12.23486	0.00000	3.498	0.000	0.00E+00	47.00%	52.38%
0.920	1.347	12.26095	0.00000	3.502	0.000	0.00E+00	47.05%	52.32%
0.940	1.319	12.28776	0.00000	3.505	0.000	0.00E+00	47.08%	52.28%
0.960	1.291	12.31533	0.00000	3.509	0.000	0.00E+00	47.13%	52.23%
0.980	1.265	12.34365	0.00000	3.513	0.000	0.00E+00	47.19%	52.18%
1.000	1.240	12.37275	0.00000	3.517	0.000	1.23E-07	47.24%	52.12%
1.020	1.215	12.40265	0.00000	3.522	0.000	2.98E-02	47.23%	51.95%
1.040	1.192	12.43336	0.00001	3.526	0.000	8.54E-02	47.17%	51.69%
1.060	1.169	12.46490	0.00002	3.531	0.000	2.32E-01	46.93%	51.10%
1.080	1.148	12.49731	0.00004	3.535	0.000	5.81E-01	46.28%	49.81%
1.100	1.127	12.53059	0.00008	3.540	0.000	1.33E+00	44.95%	47.22%
1.120	1.107	12.56479	0.00017	3.545	0.000	2.78E+00	42.68%	42.69%
1.140	1.087	12.59991	0.00033	3.550	0.000	5.32E+00	39.62%	35.97%
1.160	1.069	12.63595	0.00057	3.555	0.000	9.35E+00	36.43%	27.67%
1.180	1.051	12.67294	0.00091	3.560	0.000	1.52E+01	33.94%	19.14%
1.200	1.033	12.71086	0.00136	3.565	0.000	2.33E+01	32.48%	11.64%
1.220	1.016	12.74972	0.00194	3.571	0.000	3.36E+01	31.90%	6.24%
1.240	1.000	12.78952	0.00265	3.576	0.000	4.65E+01	31.75%	2.87%
1.260	0.984	12.83026	0.00348	3.582	0.000	6.20E+01	31.76%	1.13%
1.280	0.968	12.87196	0.00443	3.588	0.001	8.02E+01	31.82%	0.38%
1.300	0.954	12.91463	0.00552	3.594	0.001	1.01E+02	31.88%	0.11%
1.320	0.939	12.95828	0.00673	3.600	0.001	1.25E+02	31.95%	0.03%
1.340	0.925	13.00292	0.00808	3.606	0.001	1.52E+02	32.01%	0.01%
1.360	0.912	13.04857	0.00954	3.612	0.001	1.82E+02	32.08%	0.00%
1.380	0.898	13.09524	0.01114	3.619	0.002	2.15E+02	32.15%	0.00%
1.400	0.885	13.14295	0.01287	3.625	0.002	2.52E+02	32.21%	0.00%
1.420	0.873	13.19172	0.01427	3.632	0.002	2.92E+02	32.29%	0.00%
1.440	0.861	13.24157	0.01670	3.639	0.002	3.35E+02	32.36%	0.00%
1.460	0.849	13.29251	0.01881	3.646	0.003	3.82E+02	32.44%	0.00%
1.480	0.838	13.34457	0.02104	3.653	0.003	4.32E+02	32.51%	0.00%
1.500	0.826	13.39777	0.02340	3.660	0.003	4.86E+02	32.58%	0.00%
1.520	0.816	13.45214	0.02590	3.668	0.004	5.44E+02	32.67%	0.00%
1.540	0.805	13.50770	0.02851	3.675	0.004	6.06E+02	32.74%	0.00%
1.560	0.795	13.56447	0.03126	3.683	0.004	6.71E+02	32.82%	0.00%
1.580	0.785	13.62248	0.03413	3.691	0.005	7.41E+02	32.91%	0.00%
1.600	0.775	13.68177	0.03714	3.699	0.005	8.14E+02	32.99%	0.00%
1.620	0.765	13.74235	0.04027	3.707	0.005	8.92E+02	33.07%	0.00%
1.640	0.756	13.80427	0.04352	3.715	0.006	9.74E+02	33.16%	0.00%
1.660	0.747	13.86756	0.04691	3.724	0.006	1.06E+03	33.25%	0.00%
1.680	0.738	13.93224	0.05042	3.733	0.007	1.15E+03	33.34%	0.00%
1.700	0.729	13.99836	0.05406	3.741	0.007	1.25E+03	33.43%	0.00%
1.720	0.721	14.06597	0.05783	3.750	0.008	1.34E+03	33.52%	0.00%
1.740	0.712	14.13509	0.06173	3.760	0.008	1.45E+03	33.62%	0.00%

1.760	0.704	14.20577	0.06575	3.769	0.009	1.56E+03	33.71%	0.00%
1.780	0.696	14.27805	0.06990	3.779	0.009	1.67E+03	33.81%	0.00%
1.800	0.689	14.35198	0.07418	3.788	0.010	1.79E+03	33.91%	0.00%
1.820	0.681	14.42761	0.07859	3.798	0.010	1.91E+03	34.01%	0.00%
1.840	0.674	14.50499	0.08312	3.809	0.011	2.04E+03	34.12%	0.00%
1.860	0.666	14.58417	0.08778	3.819	0.011	2.17E+03	34.22%	0.00%
1.880	0.659	14.66521	0.09257	3.830	0.012	2.30E+03	34.33%	0.00%
1.900	0.652	14.74816	0.09749	3.840	0.013	2.45E+03	34.43%	0.00%
1.920	0.646	14.83308	0.10254	3.851	0.013	2.59E+03	34.54%	0.00%
1.940	0.639	14.92004	0.10771	3.863	0.014	2.74E+03	34.66%	0.00%
1.960	0.632	15.00910	0.11301	3.874	0.015	2.90E+03	34.77%	0.00%
1.980	0.626	15.10034	0.11844	3.886	0.015	3.06E+03	34.89%	0.00%
2.000	0.620	15.19384	0.12400	3.898	0.016	3.23E+03	35.01%	0.00%
2.020	0.614	15.28968	0.12968	3.910	0.017	3.40E+03	35.13%	0.00%
2.040	0.608	15.38794	0.13549	3.923	0.017	3.57E+03	35.25%	0.00%
2.060	0.602	15.48873	0.14143	3.936	0.018	3.75E+03	35.38%	0.00%
2.080	0.596	15.59212	0.14750	3.949	0.019	3.94E+03	35.51%	0.00%
2.100	0.590	15.69824	0.15370	3.962	0.019	4.13E+03	35.63%	0.00%
2.120	0.585	15.80718	0.16002	3.976	0.020	4.33E+03	35.77%	0.00%
2.140	0.579	15.91908	0.16647	3.990	0.021	4.53E+03	35.91%	0.00%
2.160	0.574	16.03405	0.17305	4.004	0.022	4.73E+03	36.04%	0.00%
2.180	0.569	16.15224	0.17976	4.019	0.022	4.94E+03	36.18%	0.00%
2.200	0.563	16.27378	0.18659	4.034	0.023	5.16E+03	36.33%	0.00%
2.220	0.558	16.39887	0.19355	4.050	0.024	5.38E+03	36.48%	0.00%
2.240	0.553	16.52765	0.20064	4.065	0.025	5.60E+03	36.62%	0.00%
2.260	0.549	16.66031	0.20787	4.082	0.025	5.83E+03	36.78%	0.00%
2.280	0.544	16.79708	0.21525	4.099	0.026	6.07E+03	36.94%	0.00%
2.300	0.539	16.93813	0.22272	4.116	0.027	6.31E+03	37.10%	0.00%
2.320	0.534	17.08365	0.23038	4.133	0.028	6.55E+03	37.26%	0.00%
2.340	0.530	17.23393	0.23822	4.151	0.029	6.81E+03	37.42%	0.00%
2.360	0.525	17.38925	0.24628	4.170	0.030	7.07E+03	37.60%	0.00%
2.380	0.521	17.54991	0.25462	4.189	0.030	7.33E+03	37.77%	0.00%
2.400	0.517	17.71621	0.26331	4.209	0.031	7.61E+03	37.95%	0.00%
2.420	0.512	17.88853	0.27244	4.230	0.032	7.90E+03	38.14%	0.00%
2.440	0.508	18.06721	0.28215	4.251	0.033	8.21E+03	38.33%	0.00%
2.460	0.504	18.25261	0.29257	4.272	0.034	8.54E+03	38.52%	0.00%
2.480	0.500	18.44514	0.30386	4.295	0.035	8.89E+03	38.73%	0.00%
2.500	0.496	18.64519	0.31623	4.318	0.037	9.28E+03	38.93%	0.00%
2.520	0.492	18.85316	0.32989	4.342	0.038	9.71E+03	39.14%	0.00%
2.540	0.488	19.06947	0.34509	4.367	0.040	1.02E+04	39.36%	0.00%
2.560	0.484	19.29454	0.36208	4.393	0.041	1.07E+04	39.59%	0.00%
2.580	0.480	19.52880	0.38115	4.419	0.043	1.13E+04	39.81%	0.00%
2.600	0.477	19.77257	0.40264	4.447	0.045	1.19E+04	40.05%	0.00%
2.620	0.473	20.02687	0.42686	4.475	0.048	1.27E+04	40.29%	0.00%
2.640	0.470	20.29165	0.45420	4.505	0.050	1.35E+04	40.54%	0.00%
2.660	0.466	20.56762	0.48502	4.535	0.053	1.44E+04	40.79%	0.00%
2.680	0.463	20.85532	0.51976	4.567	0.057	1.55E+04	41.06%	0.00%
2.700	0.459	21.15532	0.55885	4.600	0.061	1.66E+04	41.33%	0.00%
2.720	0.456	21.46823	0.60275	4.634	0.065	1.79E+04	41.61%	0.00%
2.740	0.452	21.79470	0.65194	4.669	0.070	1.94E+04	41.90%	0.00%

2.660	0.466	20.56762	0.48502	4.535	0.053	1.44E+04	40.79%	0.00%
2.680	0.463	20.85532	0.51976	4.567	0.057	1.55E+04	41.06%	0.00%
2.700	0.459	21.15532	0.55885	4.600	0.061	1.66E+04	41.33%	0.00%
2.720	0.456	21.46823	0.60275	4.634	0.065	1.79E+04	41.61%	0.00%
2.740	0.452	21.79470	0.65194	4.669	0.070	1.94E+04	41.90%	0.00%
2.760	0.449	22.13544	0.70694	4.705	0.075	2.10E+04	42.19%	0.00%
2.780	0.446	22.49115	0.76829	4.743	0.081	2.28E+04	42.49%	0.00%
2.800	0.443	22.86266	0.83654	4.782	0.087	2.48E+04	42.80%	0.00%
2.820	0.440	23.25086	0.91228	4.823	0.095	2.70E+04	43.12%	0.00%
2.840	0.436	23.65679	0.99612	4.865	0.102	2.95E+04	43.44%	0.00%
2.860	0.433	24.08159	1.08869	4.909	0.111	3.22E+04	43.78%	0.00%
2.880	0.430	24.52659	1.19066	4.954	0.120	3.51E+04	44.12%	0.00%
2.900	0.427	24.99333	1.30270	5.001	0.130	3.83E+04	44.48%	0.00%
2.920	0.425	25.48364	1.42552	5.050	0.141	4.18E+04	44.84%	0.00%
2.940	0.422	25.99970	1.55986	5.101	0.153	4.56E+04	45.22%	0.00%
2.960	0.419	26.54423	1.70647	5.155	0.166	4.97E+04	45.61%	0.00%
2.980	0.416	27.12064	1.86617	5.211	0.179	5.41E+04	46.01%	0.00%
3.000	0.413	27.73337	2.03987	5.270	0.194	5.89E+04	46.43%	0.00%
3.020	0.410	28.38838	2.22883	5.332	0.209	6.40E+04	46.86%	0.00%
3.040	0.408	29.09379	2.43518	5.399	0.226	6.95E+04	47.32%	0.00%
3.060	0.405	29.86039	2.66298	5.470	0.243	7.55E+04	47.81%	0.00%
3.080	0.402	30.70195	2.91991	5.547	0.263	8.22E+04	48.32%	0.00%
3.100	0.400	31.63452	3.21932	5.632	0.286	8.98E+04	48.88%	0.00%
3.120	0.397	32.67491	3.58228	5.725	0.313	9.90E+04	49.47%	0.00%
3.140	0.395	33.83825	4.03910	5.827	0.347	1.10E+05	50.12%	0.00%
3.160	0.392	35.13510	4.63036	5.940	0.390	1.25E+05	50.82%	0.00%
3.180	0.390	36.56792	5.40737	6.064	0.446	1.44E+05	51.58%	0.00%
3.200	0.387	38.12726	6.43242	6.197	0.519	1.68E+05	52.39%	0.00%
3.220	0.385	39.78669	7.77882	6.337	0.614	2.00E+05	53.24%	0.00%
3.240	0.383	41.49542	9.53092	6.483	0.735	2.41E+05	54.13%	0.00%
3.260	0.380	43.16604	11.78282	6.630	0.889	2.94E+05	55.06%	0.00%
3.280	0.378	44.65250	14.63067	6.769	1.081	3.59E+05	55.99%	0.00%
3.300	0.376	47.71726	18.14163	6.888	1.317	4.41E+05	56.92%	0.00%
3.320	0.373	46.01252	22.27232	6.969	1.598	5.38E+05	57.80%	0.00%
3.340	0.371	45.14623	26.74359	6.986	1.914	6.48E+05	58.56%	0.00%