

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

Microscopía combinada de alta resolución. Aplicaciones a la plasmónica y la biofísica

Masip, Martín E.

2011

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Microscopía combinada de alta resolución. Aplicaciones a la plasmónica y la biofísica

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

por *Martín E. Masip*

Director del trabajo: Dra. Andrea V. Bragas
Lugar de trabajo: Laboratorio de Electrónica Cuántica

14 de Marzo de 2011

Índice general

1. Introducción	7
1.1. Breve reseña de las microscopías	7
1.2. Microscopía combinada: aplicación a la plasmónica	9
1.3. Microscopía espectral combinada: aplicación a la biofísica	12
2. Desarrollo de fuentes de luz	15
2.1. Ecuación no-lineal de Schrödinger	15
2.2. Propagación de luz en fibras de cristal fotónico	20
2.3. Fuente de luz sintonizable	22
2.3.1. Arreglo experimental	22
2.3.2. Resultados y discusión	24
2.4. Fuente de luz blanca	30
2.5. Conclusiones y perspectivas	32
3. Microscopio AFM	33
3.1. Nociones de microscopía AFM	34
3.1.1. Modos de operación	34
3.1.2. Curvas de fuerza	34
3.1.3. Sensores de fuerza	35
3.2. El AFM-LEC	38
3.2.1. Detección de la señal topográfica	39
3.2.2. Lazo de control	39
3.2.3. Unidad de barrido	40
3.3. Imágenes de alta resolución	42

3.4. Conclusiones	45
4. Microscopia óptica espectral. Aplicaciones a la plasmónica.	47
4.1. Descripción general del equipo	47
4.1.1. Iluminación	48
4.1.2. Detección	49
4.2. Modos de adquisición de imágenes del microscopio óptico espectral .	50
4.2.1. Campo brillante	50
4.2.2. Fluorescencia <i>wide-field</i>	50
4.2.3. Sistema de detección confocal	51
4.2.4. Detección espectral interferométrica	52
4.3. Espectros de nanopartículas metálicas únicas	55
4.3.1. Teoría de Mie	55
4.3.2. Medidas del espectro de nanopartículas únicas	58
4.4. Espectros de sondas plasmónicas únicas	61
4.4.1. Espectros de microesferas de sílice (ME)	63
4.4.2. Espectros de microesferas decoradas	66
4.5. Conclusiones	70
5. Microscopio Combinado AFM-Óptico. Aplicaciones a la plasmónica.	72
5.1. Fabricación de las sondas plasmónicas <i>in-situ</i>	75
5.2. Medición de espectros en función de la altura	77
5.3. Conclusiones	82
6. Microscopio Combinado: Resultados en biología	85
6.1. Introducción y motivación	85
6.2. Microscopio combinado para aplicaciones en biología celular	88
6.3. Expresión y localización de las proteínas de fusión EGFP-Zyxina, y FAK en células HC11 mediante microscopía confocal de fluorescencia	94
6.4. Análisis por FRAP de las propiedades de unión de proteínas las ad- hesiones focales en clulas HC11	96
6.5. Conclusiones	99

7. Conclusiones y perspectivas	102
7.1. Conclusiones	102
7.2. Perspectivas	103
A. Cultivo y tratamiento de células HC11	105
A.1. Cultivo	105
A.2. Plaqueo	105
A.3. Medio de cultivo completo	106
A.4. Plaqueo sobre cubreobjetos (25mm o 10mm)	106
A.4.1. Esterilización de cubreobjetos	106
A.4.2. Coating de cubres con proteínas de matriz extracelular	107
A.5. Transfección	107
A.6. Medio de transfección	108
A.7. Fijación	108
B. Acrónimos	109

Resumen

En este trabajo se presenta el diseño y construcción de un microscopio multipropósito, que combina un cabezal AFM y un microscopio óptico espectral. Con la plataforma construida se logró la fabricación y caracterización de sondas plasmónicas, y la visualización óptica y topográfica simultánea de sistemas celulares.

Diversas fuentes de luz están disponibles para este microscopio, entre las que se destaca una fuente de luz de pulsos sintonizables en longitud de onda basada en una fibra de cristal fotónico desarrollada especialmente para este trabajo.

El microscopio, construido en su totalidad durante esta Tesis, presenta características de estabilidad, resolución lateral y resolución espectral, que permitieron el abordaje de problemas en los que es relevante la combinación de dos escalas, la micrométrica y la nanométrica, así como el estudio de distintas propiedades físico-químicas o biológicas simultáneamente.

Abstract

High resolution combined microscopy. Applications to plasmonics and biophysics

In this work, entitled *High resolution combined microscopy. Applications to plasmonics and biophysics*”, the design and construction of a multipurpose microscope that combines both an AFM terminal and an optical spectral microscope is presented. The platform already built allows the fabrication and characterization of plasmonic probes and the simultaneous optical and topographic observation of cellular systems.

Different light sources are available for this microscope. Among the most remarkable, we find a light source of wavelength tunable pulses based on a photonic crystal fiber developed specifically for this project.

The microscope, completely built during this thesis project, presents stability characteristics, lateral resolution and spectral resolution that made possible the approach to problems where the combination of two different scales are relevant, the micrometric and the nanometric, likewise the study of different physicochemical or biological properties.

Capítulo 1.

Introducción

1.1. Breve reseña de las microscopías

Los orígenes de la microscopía nos remontan al siglo XVII. Podemos atribuirle a Galileo Galilei haber dado el puntapié inicial con la construcción del telescopio presentado en 1629. Años después Robert Hooke y Antoni van Leeuwenhoek mejorarían el diseño original y lo utilizarían para realizar y documentar observaciones de sistemas biológicos. Fue el mismo Hooke quien introdujo el término *cell* (célula) para describir pequeños organismos que había observado con su microscopio y que publicó en su *Micrographia*. En 1882 Ernst Abbe encuentra que hay un límite de resolución en la microscopía óptica, dada por la relación

$$\Delta x = 0,61 \frac{\lambda}{NA}, \quad (1.1)$$

donde λ es la longitud de onda con la que se ilumina y NA la apertura numérica de la lente con la que se enfoca la luz sobre la muestra. Este límite es muy fuerte, nos impide observar detalles más pequeños que $\sim 200\text{-}300$ nm utilizando un microscopio óptico iluminando la muestra con luz visible. Entonces, si queremos ir más allá y observar con más detalle los sistemas de tamaño nanométrico, tenemos que desarrollar técnicas que lo permitan, técnicas que empujen ese límite más abajo. A esto se ha dedicado parte de la comunidad científica a lo largo del siglo XX, en el que han aparecido microscopías que logran resoluciones atómicas. En el año 1928 Synge propuso la idea del microscopio óptico de campo cercano [Synge, 1928], para lograr alta reso-

lución, pero el desarrollo tecnológico de la época impidió concretar la idea. En 1932 hace su aparición el microscopio electrónico de transmisión [Ruska and Knoll, 1932], que utiliza electrones en lugar de luz para observar la muestra y logra hoy en día resoluciones por debajo de 1 nm. Cinco años después se presenta el microscopio electrónico de barrido (SEM) pero no se fabrica uno hasta 1965. En 1957 aparece la técnica confocal que es patentada en 1961 y que va a ser explotada fuertemente en aplicaciones a sistemas biológicos con la utilización de proteínas fluorescentes, descubiertas en 1962 y clonadas treinta años más tarde para ser utilizadas como marcadores intracelulares [Shimomura et al., 1962, Chalfie et al., 1994]. La técnica confocal no mejora el límite de Abbe pero permite reducir el volumen de detección, mejorando la resolución axial de la microscopía óptica. A partir de 1980 comienzan a aparecer las microscopías de barrido por sondas (SPM), en las que una punta que se barre sobre una muestra con la que interactúa, y de esa interacción se registra la topografía y otras propiedades, como ser la conductancia, la fuerza de adhesión, la respuesta espectroscópica o la composición química. En 1981 se desarrolla el microscopio túnel (STM) [Binnig et al., 1982], un microscopio de barrido que utiliza como interacción la corriente túnel entre una punta y una muestra conductora, que logra resolución atómica. Cuatro años después, y en el mismo grupo, se desarrolla el microscopio de fuerza atómica (AFM) [Binnig et al., 1986], que utiliza como interacción la fuerza atómica entre una punta y la muestra a observar, y también puede lograr resolución atómica. En la misma década hace su aparición la microscopía óptica de campo cercano (SNOM) [Novotny et al., 1995, Lewis et al., 1984], una técnica que utiliza la interacción de campo cercano, el campo no-propagante, entre la punta y la muestra [Novotny and Hecht, 2006, Ohtsu and Hori, 1999], alcanzando resoluciones del orden de algunos nanómetros. Las técnicas STM, AFM y SNOM utilizan la misma plataforma: Una unidad de barrido y una unidad de detección y control de posición.

Cada microscopía mencionada tiene una aplicación y permite observar propiedades determinadas de las muestras. Por ejemplo, la microscopía SEM permite ver con detalle la forma y composición de un objeto con resolución de 1 nm pero no permite

estudiar la respuesta de esa misma muestra a distintas longitudes de onda. Con la microscopía AFM podemos estudiar la topografía de una célula y estudiar molecularmente su superficie, pero no podemos seguir procesos de proteínas intracelulares, cosa que si podemos hacer con las microscopías ópticas de fluorescencia. De esta forma, el estudio exhaustivo de un sistema particular puede requerir la utilización de técnicas complementarias.

1.2. Microscopía combinada: aplicación a la plasmónica

El laboratorio ha desarrollado una microscopía óptica por intensificación de campo (FESOM) [Bragas and Martínez, 1998], que es una técnica de la familia de las SNOM. Una sonda plasmónica se acerca a una muestra a distancias nanométricas, al mismo tiempo que se hace incidir un haz láser sobre ambos, de forma tal que la sonda genere una intensificación muy localizada del campo eléctrico cercano. Debido a la excitación resonante de plamones de la sonda la intensificación depende del material de la sonda, de su geometría, de la longitud de onda y de la polarización del campo incidente. En la Fig.1.1 se presenta un esquema del funcionamiento del FESOM. Un láser es enfocado sobre la juntura sonda-muestra y se produce una intensificación localizada del campo eléctrico (esta localización va a determinar la resolución lateral del microscopio). Luego se colecta en campo lejano la luz de la unión que es dispersada, y de allí se obtiene la información de la muestra [Bragas and Martínez, 1998, Scarpettini et al., 2009, Novotny and Hecht, 2006]. La información obtenida puede utilizarse para realimentar la posición perpendicular a la superficie, utilizando un lazo de control y obtener imágenes de topografía, y también puede utilizarse para obtener datos de la composición química de las distintas partes que componen la muestra. El FESOM puede utilizarse, por ejemplo, para obtener infromación de una muestra que sea químicamente inhomogénea pero topográficamente plana, ver Fig.1.1(b). El microscopio FESOM desarrollado en el laboratorio sobre una plataforma STM, y las dos imágenes, túnel y óptica, pueden adquirirse simultáneamente. Para medir la señal óptica de la interacción se hace oscilar la muestra y se realiza una detección *lock-in* homodina. De esta manera se

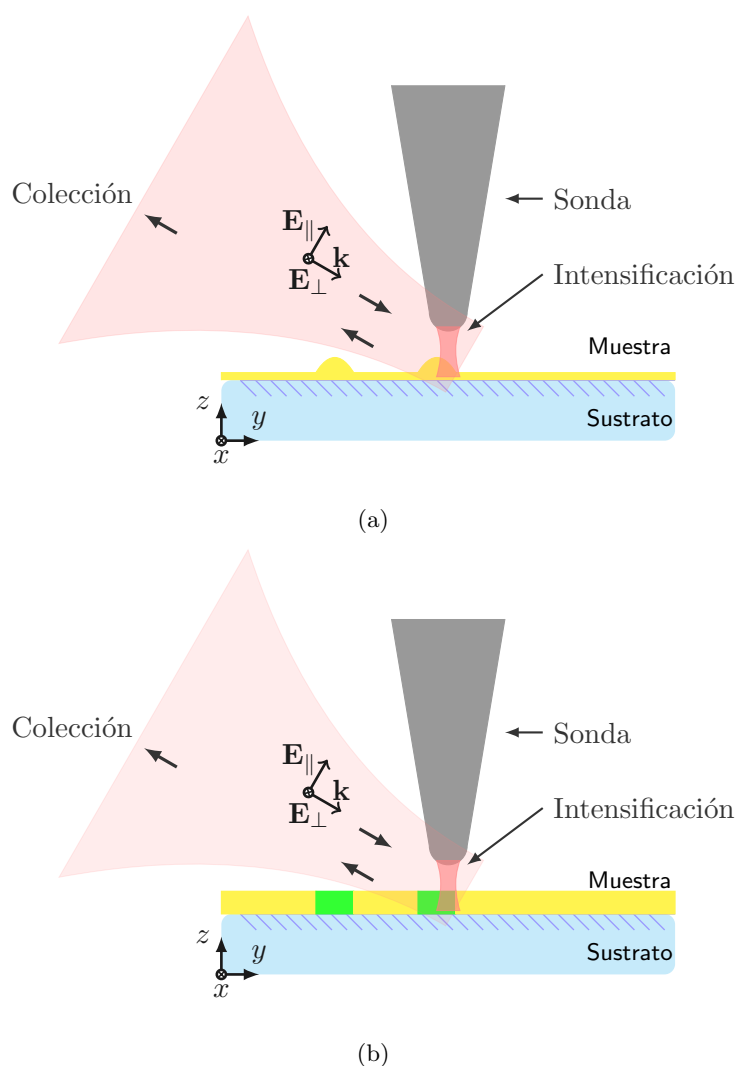


Figura 1.1.: Esquema de la interacción en un microscopio óptico de intensidad de campo. (a) Extracción de información topográfica. (b) Extracción de información química.

puede separar la señal proveniente de la interacción (que es una señal pequeña) de la señal de fondo.

Las sondas plasmónicas más utilizadas son las puntas metálicas y se fabrican usualmente por corte de un alambre del metal con un alicate, por ataque electroquímico del alambre y por ataque con un haz de iones. La técnica de corte produce puntas irregulares y no es reproducible. La técnica de ataque electroquímico produ-

ce puntas con simetría de revolución y son reproducibles. La técnica de ataque de iones permite fabricar puntas con más grados de libertad (se pueden fabricar puntas que no tengan simetría de revolución) y son reproducibles [Vasile et al., 2009]. En el orden en que fueron mencionadas, las técnicas de fabricación de puntas tienen una complejidad, un tiempo de fabricación y un costo creciente.

Dado que en la microscopía FESOM la resolución del microscopio va a estar determinada por la intensificación del campo cercano y su distribución espacial, es necesario fabricar puntas de un material y con una geometría que permitan generarla. Si uno logra fabricar una punta de un material determinado, con la geometría y las dimensiones diseñadas para generar la intensificación a una longitud de onda, entonces se puede utilizar la misma punta para todos los experimentos. Esto se puede lograr utilizando alguna de las técnicas mencionadas. Por el contrario, si uno no puede repetir la estructura de la punta (como es el caso del método de fabricación por corte), las características ópticas van a cambiar y vamos a tener que realizar mediciones para conocer la respuesta óptica de la punta. Existen varios métodos para fabricar puntas para FESOM basadas en estructuras plasmónicas, principalmente métodos para adherir a una punta una nanopartícula [Gan, 2007], que es la estructura plasmónica más simple. En [Scarpettini and Bragas, 2010] se presenta un método de fabricación de sondas que consiste en fabricar primero una estructura plasmónica reproducible (esferas de sílice decoradas con nanopartículas), y luego adherirlas a una punta fabricada por alguno de los métodos mencionados previamente (se sumerge la punta en una solución de las sondas plasmónicas). Este método permite fabricar puntas que producen buena intensificación, pero no son fácilmente reproducibles. Esto se debe a que las estructuras plasmónicas que se adhieren a la punta, y por lo tanto la que va a quedar más cerca de la muestra y va a interactuar, no tienen la mismas características plasmónicas. Entonces, a cada punta fabricada hay que caracterizarla ópticamente para conocer la longitud de onda a la que hay que excitarla para que haya intensificación.

El abordaje para la fabricación de puntas plasmónicas que proponemos en este trabajo es utilizar una microesfera decorada de las utilizadas en el trabajo de Scar-

pettini et al. [Scarpettini and Bragas, 2010] y, caracterizarla espectralmente y adherirla al ápice de una punta de AFM, todo en un mismo lugar, con un mismo aparato. El uso de una plataforma AFM en lugar de una STM, le confiere una versatilidad mayor al instrumento, ya que permite analizar también muestras no conductoras. De esta forma, se pueden fabricar puntas con las mismas características plasmónicas de manera repetitiva.

Con este fin, en este trabajo se presenta la construcción de un microscopio que combina la microscopía óptica con la microscopía AFM. La parte óptica permite realizar mediciones de espectroscopía de las sondas plasmónicas. La parte AFM permite posicionar la punta y acercarla al sustrato para adherir las sondas plasmónicas. Utilizando la metodología descrita se presentan resultados de la fabricación de sondas plasmónicas con caracterización óptica *in-situ*, formadas por una microesfera de sílice decorada con nanopartículas de oro, pegada a una punta de AFM. Se presentan también mediciones espectrales de las sondas plasmónicas en función de la distancia punta-muestra, que son, según nuestro conocimiento, las primeras en su tipo.

1.3. Microscopía espectral combinada: aplicación a la biofísica

Grandes avances en la biología molecular y celular se han producido con el descubrimiento de las proteínas fluorescentes de fusión [Shimomura et al., 1962], y su posterior utilización como marcadores intracelulares [Chalfie et al., 1994], y con el desarrollo de las microscopías de fluorescencia, *wide-field* y confocal, de la mano de los avances tecnológicos. Desde entonces se vienen haciendo importantes descubrimientos del funcionamiento de las células desde el punto de vista genómico y proteómico. Las células tienen funciones muy especializadas para mantener su estructura interna y para desenvolverse en su medio ambiente. Parte de los mecanismos de adaptación y respuesta de las células están vinculados a los receptores de la membrana celular. Estos receptores son los encargados de iniciar una respuesta ante estímulos extracelulares. Estos estímulos pueden desencadenar una cascada

de señalización intracelular que conlleve a la expresión de algún gen particular que modifique la actividad de la célula. Estas respuestas puede ser del tipo dinámico, morfológico, pueden ser cambios en el comportamiento, e incluso pueden llevar a la muerte celular.

Muchos de estos procesos están vinculados a la actividad mecánica de la célula. Las células pueden interactuar mecánicamente entre si (adhesiones de juntura) o pueden interactuar con la matriz extracelular (ECM), que es una red de proteínas que la célula reconoce y a la cual se puede adherir formando lo que se conoce como adhesiones focales. La motilidad celular, la dinámica molecular y mecánica, es importante para la división celular, la formación de tejidos y órganos [Selhuber-Unkel et al., 2008] [Delanoë-Ayari et al., 2010], la reparación de heridas, angiogénesis o metástasis de cancer, por citar algunos ejemplos importantes [Lehoux and Tedgui, 2003]. Queda claro entonces que el estudio de la dinámica de las adhesiones focales, su ensamblaje y desensamblaje, y como transducen las señales mecánicas en señales químicas, es un tópico importante en la biología celular. El estudio de las adhesiones focales es complejo. En cada adhesión focal hay unas 150 proteínas aproximadamente y unas 600 interacciones conocidas.

Distintas técnicas se han utilizado para estudiar la dinámica de las proteínas intracelulares ante un estímulo mecánico: sustratos deformables [Nicolas et al., 2008], cirugía láser de las fibras de estrés [Lele et al., 2006], relajación de las fibras de estrés [Lele et al., 2006], y AFM [Kasas and Dietler, 2008] [Pelling et al., 2009].

En este trabajo presentamos el desarrollo de un microscopio combinado AFM-Óptico para el estudio de sistemas biológicos en el marco de un proyecto de colaboración del LEC con el CMA, FCEN,UBA. Específicamente, utilizando la técnica AFM, que provee información topográfica y permite la medición de fuerzas con alta localización espacial, complementada con la microscopía óptica de fluorescencia *wide-field* y confocal, que permite localizar proteínas marcadas con fluoróforos de forma estratégica y específica, nos proponemos estudiar la dinámica de proteínas de la adhesión focal ante perturbaciones mecánicas en células vivas. Este problema presenta un doble desafío, uno es la construcción del aparato para combinar las

técnicas, el otro es la preparación del sistema biológico.

Se presentan resultados preliminares en esta dirección, que dan cuenta que el microscopio combinado desarrollado tiene las características de resolución espacial en las decenas de nanómetros, provisto por el AFM, y la resolución óptica suficiente, en el límite de difracción, para llevar adelante los experimentos de mecanotransducción. Según nuestro conocimiento, este es el primer equipo de este tipo desarrollado en Latinoamérica.

Capítulo 2.

Desarrollo de fuentes de luz

En este capítulo se presentan una fuente de luz de pulsos ultracortos sintonizables y una fuente de luz blanca, ambas basadas en fibras de cristal fotónico (PCF) que serán utilizadas en el microscopio combinado construido.

En este trabajo el objetivo principal es utilizar la fuente pulsada para realizar microscopías ópticas y la fuente de luz blanca para la caracterización de puntas de microscopio por intensificación de campo, FESOM.

Además, el desarrollo mismo de la fuente de luz presenta características muy novedosas, que ameritan un estudio sistemático de la fuente, independientemente del uso que se le dará posteriormente.

2.1. Ecuación no-lineal de Schrödinger

Vamos a abordar el problema de la propagación de campos intensos de luz en fibras ópticas, para lo cual necesitamos introducirnos en el estudio de la llamada ecuación no-lineal de Schrödinger (NLSE).

De las ecuaciones de Maxwell para medios que no son magnéticos podemos derivar la ecuación de ondas que describe la propagación del campo eléctrico \mathbf{E} en la fibra [Agrawal, 2001],

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} = -\frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} - \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{P}}{\partial t^2}, \quad (2.1)$$

donde \mathbf{P} es la polarización inducida en la fibra y c es la velocidad de la luz.

Así como está presentada, la Ec.(2.1) no se puede resolver, falta una ecuación que vincule \mathbf{P} y \mathbf{E} . Fenomenológicamente, la relación que existe entre la polarización del medio \mathbf{P} y el campo eléctrico macroscópico \mathbf{E} la podemos escribir como

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \epsilon_0(\chi^{(1)} \cdot \mathbf{E} + \chi^{(2)} : \mathbf{E}\mathbf{E} + \chi^{(3)} \vdots \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots), \quad (2.2)$$

donde ϵ_0 es la permitividad del vacío y $\chi^{(j)}$ (tensores de rango $j + 1$) son las susceptibilidades de orden j que dan cuenta de la respuesta del medio respecto del campo aplicado [Mills, 1991]. La respuesta del medio puede ser no-local y además depender, a tiempo t , de lo que ocurrió en la fibra en tiempos anteriores, $t' < t$. Escribimos la Ec.(2.2) como la suma de una contribución lineal, primer término, y una contribución no-lineal, que contiene los términos restantes, como

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{P}_L(\mathbf{r}, t) + \mathbf{P}_{NL}(\mathbf{r}, t). \quad (2.3)$$

Si utilizamos la relación

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} = \nabla(\nabla \cdot \mathbf{E}) - \nabla^2 \mathbf{E}, \quad (2.4)$$

junto con la aproximación $\nabla \cdot \mathbf{D} = \epsilon \nabla \cdot \mathbf{E} = 0$ (se puede mostrar que el primer término de Ec.(2.4) es lo suficientemente pequeño como para despreciarlo) y las Ecs.(2.1) y (2.3) [Mills, 1991], podemos escribir la ecuación que tenemos que resolver como

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{P}_L}{\partial t^2} + \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{P}_{NL}}{\partial t^2}. \quad (2.5)$$

Si consideramos que la respuesta en la fibra es local y teniendo en cuenta que para la sílice (*SiO₂*, material del que está hecha la fibra) $\chi^{(2)} = 0$, entonces la polarización de orden 1, P_L , se puede escribir como

$$\mathbf{P}_L(\mathbf{r}, t) = \epsilon_0 \int_{-\infty}^t \chi^{(1)}(t - t_1) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t_1) dt_1. \quad (2.6)$$

La polarización no lineal, podemos escribirla en términos de la susceptibilidad de tercer orden χ^3 como:

$$\mathbf{P}_{NL}(\mathbf{r}, t) = \epsilon_0 \int_{-\infty}^t \int_{-\infty}^t \int_{-\infty}^t \chi^{(3)}(t-t_1, t-t_2, t-t_3) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t_1) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t_2) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t_3) dt_1 dt_2 dt_3. \quad (2.7)$$

Si tenemos en cuenta solo las interacciones de fonones y los efectos electrónicos no-resonantes y descartamos las interacciones electrónicas resonantes, la susceptibilidad se puede escribir de la siguiente forma:

$$\chi^{(3)}(t-t_1, t-t_2, t-t_3) = \chi_0^{(3)} R(t-t_1) \delta(t_1-t_2) \delta(t_2-t_3), \quad (2.8)$$

donde $R(t)$ es la función de respuesta de la fibra [Stolen et al., 1989][Agrawal, 2001]. Si utilizamos la Ec.(2.8) en la Ec.(2.7), se obtiene la ecuación

$$\mathbf{P}_{NL}(\mathbf{r}, t) = \epsilon_0 \chi_0^3 E(\mathbf{r}, t) \int_{-\infty}^t R(t-t') \mathbf{E}^2(\mathbf{r}, t') dt', \quad (2.9)$$

en la que puede verse que la función de respuesta actúa sobre la intensidad del campo eléctrico [Blow and Wood, 1989]. Este es el término relevante que da origen a los fenómenos no lineales en fibras.

Con las Ecs.(2.1), (2.3), (2.6) y (2.9), junto con las condiciones de contorno, tenemos planteado el problema de la propagación de ondas en una fibra óptica.

El campo eléctrico $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$ se puede escribir como superposición de ondas monocromáticas,

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{E}(z, \omega) F(x, y, \omega) e^{i(\beta(\omega)z - \omega t)} d\omega, \quad (2.10)$$

en donde hemos utilizado que en la Ec.(2.5) se pueden separar las variables transversales y longitudinal ($\nabla^2 = \nabla_{\perp}^2 + \partial^2/\partial z^2$).

Utilizando las Ecs.(2.6), (2.9) y la (2.10) en la Ec.(2.5) puede verse que en el espacio de frecuencias la ecuación para el campo transversal $F(x, y, \omega)$ es, como se muestra en [Mamyshev and Chernikov, 1990],

$$\frac{\partial^2 F(x, y, \omega)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 F(x, y, \omega)}{\partial y^2} + \left(\epsilon(x, y, \omega) \frac{\omega^2}{c^2} - \beta^2(\omega) \right) F(x, y, \omega) = 0, \quad (2.11)$$

y para el campo que se propaga a lo largo de la fibra, $E(z, \omega)$, es

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 E(z, \omega)}{\partial z^2} + 2i\beta(\omega) \frac{\partial E(z, \omega)}{\partial z} = & \\ & \frac{-4\pi\omega^2 \chi_0^{(3)}}{c^2} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} E(z, \omega_1) F(x, y, \omega_1) E(z, \omega_2) F(x, y, \omega_2) \\ & E^*(z, \omega_1 + \omega_2 - \omega) F(x, y, \omega_1 + \omega_2 - \omega) \\ & \chi^{(3)}(\omega - \omega_1) e^{(i\Delta\beta z)} d\omega_1 d\omega_2, \end{aligned} \quad (2.12)$$

donde

$$\epsilon(\omega, x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \epsilon(t, x, y) e^{i\omega t} dt, \quad (2.13)$$

$$\Delta\beta = \beta(\omega_1) + \beta(\omega_2) - \beta(\omega_1 + \omega_2 - \omega) - \beta(\omega), \quad (2.14)$$

$$\tilde{\chi}^{(3)}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} R(t) e^{i\omega t} dt. \quad (2.15)$$

La parte real de $\tilde{\chi}^{(3)}(\Delta\omega)$ es responsable de los efectos que dependen de la intensidad del pulso, estos son los efectos paramétricos y los efectos de automodulación de fase. La parte imaginaria de $\tilde{\chi}^{(3)}(\Delta\omega)$ es responsable de la respuesta Raman de la fibra. La Ec.(2.11) es la ecuación para los modos transversales de la fibra. La Ec.(2.12) es la ecuación de propagación a lo largo de la fibra. En nuestro caso, se puede ver que en la Ec.(2.12) el término de la derivada segunda del campo eléctrico es mucho menor que los demás [Agrawal, 2001] y por lo tanto aproximar al campo eléctrico como una función que varía lentamente a lo largo de z . Haciendo esta aproximación y realizando un promedio de la Ec.(2.12) en las variables transversales, x e y , podemos reescribirla y obtener

$$\begin{aligned} \frac{\partial E(z, \omega)}{\partial z} = & \frac{-2\pi\omega^2 \chi_0^{(3)}}{c^2 \beta(\omega)} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} G(\omega, \omega_1, \omega_2) E(z, \omega_1) E(z, \omega_2) \\ & E^*(z, \omega_1 + \omega_2 - \omega) \chi^{(3)}(\omega - \omega_1) e^{(i\Delta k z)} d\omega_1 d\omega_2. \end{aligned} \quad (2.16)$$

En la Ec.(2.16) la función $G(\omega, \omega_1, \omega_2)$ depende del modo transversal $F(x, y, \omega)$ y puede ser aproximada, considerando un modo transversal gaussiano, como

$$G(\omega, \omega_1, \omega_2) = \frac{1}{2} [S(\omega)S(\omega_1)S(\omega_2)S(\omega_1 + \omega_2 - \omega)] \quad (2.17)$$

donde

$$S(\omega) = \frac{A_{eff}(\omega)}{A_{eff}(\omega_0)}, \quad (2.18)$$

siendo ω_0 la frecuencia central del pulso y

$$A_{eff}(\omega) = \frac{\left[\int_{-\infty}^{\infty} F^2(x, y, \omega) dx dy \right]^2}{\int_{-\infty}^{\infty} F^4(x, y, \omega) dx dy} \quad (2.19)$$

el área efectiva del modo. Si definimos la amplitud A como

$$A(z, \Delta\omega) = \frac{1}{\sqrt{2}} [S(\omega)]^4 E(z, \omega) e^{i[\beta(\omega) - \beta_0]z}, \quad (2.20)$$

y tenemos en cuenta que la constante de propagación $\beta(\omega)$, que depende del material y los parámetros de diseño de la fibra óptica, en general es una función desconocida y la expandimos en serie de Taylor alrededor de la frecuencia central del pulso ω_0 ,

$$\beta(\omega) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{i^{n+1}}{n!} \beta_n (\omega - \omega_0)^n, \quad (2.21)$$

entonces podemos escribir finalmente la ecuación de evolución del campo eléctrico a lo largo de una fibra óptica como

$$\begin{aligned} \frac{\partial A(z, \Delta\omega)}{\partial z} - \sum_{n \geq 1} \frac{i^{n+1}}{n!} \beta_n \Delta\omega^n A(z, \Delta\omega) = \\ \frac{-2\pi\omega^2 \chi_0^{(3)}}{c^2 \beta(\omega)} \frac{1}{\sqrt{S(\omega)}} \omega_0 \left(1 + \frac{\Delta\omega}{\omega_0} \right) \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} A(z, \Delta\omega_1) A(z, \Delta\omega_2) \\ A^*(z, \Delta\omega_1 + \Delta\omega_2 - \Delta\omega) \chi^{(3)}(\Delta\omega - \Delta\omega_1) d\omega_1 d\omega_2. \end{aligned} \quad (2.22)$$

Esta es la ecuación no-lineal de Schrödinger (NLSE), en el espacio de frecuencias [Mamyshev and Chernikov, 1990].

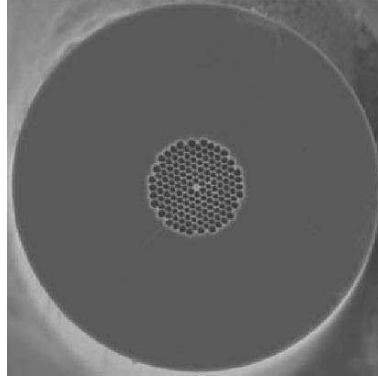


Figura 2.1.: Imagen SEM de una fibra de cristal fotónico.

2.2. Propagación de luz en fibras de cristal fotónico

Las fibras de cristal fotónico (PCF) están formadas por un núcleo de sílice (SiO_2) rodeado por un revestimiento formado por un arreglo periódico de agujeros, formando una microestructura sostenida por la misma sílice del núcleo 2.1 (a diferencia de las fibras estándar que están formadas de un núcleo y un revestimiento de sílice con dopantes).

Con la estructura de agujeros se logra que el índice de refracción del revestimiento sea cercano al del aire y que el núcleo se comporte como una barra cilíndrica de sílice rodeada por aire, confinando la luz fuertemente en la guía.

En las PCF se consigue fabricar núcleos de diámetro pequeño, de unos $\sim 2 \mu m$, y por lo tanto el área del modo que se propaga a lo largo de la fibra es pequeña (para una fibra estándar es $\sim 10 - 20 \mu m^2$). Abajo comentaremos la razón por la cual el área efectiva es un parámetro importante.

La propagación de un pulso a lo largo de una fibra óptica esta descrita por la NLSE, Ec.(2.22), que en el dominio del tiempo se escribe [Mamyshev and Chernikov, 1990] [Agrawal, 2001]

$$\frac{\partial A}{\partial z} - \sum_{n \geq 2} \frac{i^{n+1}}{n!} \beta_n \frac{\partial^n A}{\partial t^n} + \frac{\alpha}{2} A = i\gamma \left(1 + \frac{i}{\omega_0} \frac{\partial}{\partial t} \right) A \int_{-\infty}^{+\infty} R(t') |A(z, t - t')|^2 dt', \quad (2.23)$$

donde $A(t, z)$ es la transformada de Fourier de $\tilde{A}(\Delta\omega, z)$, dada por la Ec.(2.20)

y es tal que $|A|^2$ representa la potencia. El segundo término de la izquierda de la Ec.(2.23), el término correspondiente a $\beta(\omega)$, es el término que da cuenta de los efectos de dispersión en la fibra tales como la dispersión de la velocidad de grupo (GVD), β_2 , y dispersión de órdenes superiores. El miembro de la derecha da cuenta de los efectos no-lineales, donde el primer término es el de automodulación de fase (SPM) y el segundo término corresponde a la respuesta Raman de la fibra [Stolen et al., 1989]. El coeficiente no lineal γ , que da una idea de cuán importantes son los efectos no-lineales es:

$$\gamma = \frac{n_2\omega_0}{cA_{eff}}, \quad (2.24)$$

donde c es la velocidad de la luz, $\omega_0 = c\beta_0$, A_{eff} está dada por la Ec.(2.19) y

$$n_2 = \frac{3}{8n} Re\{\chi^{(3)}(\omega)\} \quad (2.25)$$

es el índice de refracción no-lineal [Agrawal, 2001].

Este coeficiente no-lineal es un parámetro de construcción de la fibra, así como con la dispersión.

La formación de solitones en fibras ópticas [Hasegawa and Tappert, 1973] puede ser entendida como la compensación entre los efectos SPM y GVD, cuando un pulso se propaga en la región anómala de dispersión, es decir, cuando la longitud de onda es tal que β_2 es negativo. El orden del solitón está definido por [Agrawal, 2001]

$$N = \gamma P_0 T_0^2 / |\beta_2|, \quad (2.26)$$

donde P_0 es la potencia pico del solitón y T_0 es el ancho temporal del pulso a $1/e$. La dispersión Raman intrapulso es un importante efecto no-lineal que produce transferencia de energía desde las componentes azules hacia las componentes rojas del pulso que se propaga en la fibra, con el consecuente corrimiento en frecuencia del pulso (RIFS) [Gordon, 1986b][Gordon, 1986a], a medida que recorre la fibra. Para un solitón de orden $N = 1$, el corrimiento en frecuencia debido a RIFS es $\Delta\nu_R = -4T_R(\gamma P_0)^2 z / 15\pi |\beta_2|$, donde T_R es el tiempo de respuesta Raman, β_2 es el parámetro de dispersión GVD y z es el largo de la fibra [Agrawal, 2001].

En fibras PCF con parámetro no-lineal γ los corrimientos en frecuencia inducidos por efecto Raman son muy efectivos con lo cual se puede obtener un rango de sintonización extenso usando fibras cortas y pulsos de baja potencia (algunos cientos de nanómetros con pulsos de algunos miliwatts) [Nishizawa et al., 1999] [Liu et al., 2001] [Nishizawa et al., 2002].

2.3. Fuente de luz sintonizable

En esta sección se presentan los resultados del desarrollo de una fuente solitónica en el infrarrojo cercano, construida a partir de una PCF bombeada con un láser pulsado de Titanio:Zafiro (Ti:Za). El trabajo realizado y presentado en este capítulo tuvo repercusión en una revista especializada dedicada cada mes a presentar los nuevos desarrollos relevantes en fotónica [Masip et al., 2009b].

2.3.1. Arreglo experimental

En la Fig.2.2 se muestra el arreglo experimental utilizado para generar los pulsos de luz sintonizables utilizando una PCF y realizar su caracterización. La fuente de bombeo es un láser de Ti:Za, fabricado por KMLabs, que provee pulsos de 40 fs de ancho a mitad de altura (FWHM) centrados típicamente en 830 nm, con una frecuencia de repetición de 94 MHz. Los pulsos del Ti:Za pasan por un compresor de prismas [Martínez et al., 1984] para precompensar la dispersión introducida por los elementos por los que pasan antes de alcanzar la fibra.

La potencia acoplada en la fibra es seleccionada utilizando un modulador acusto-óptico (AOM), modelo AOM-402N, marca IntraAction Corp., controlado por una fuente de 5W, modelo ME-40R, también de la marca por IntraAction Corp.. Controlando la eficiencia del AOM variamos la potencia acoplada en la fibra, es decir, modulando la amplitud de la señal portadora del AOM (40 MHz) se puede modular la luz que entra en la fibra hasta frecuencias nominales de 20 MHz. Este hecho pone en evidencia la ventaja de introducir el AOM: se puede modificar la potencia de entrada a la fibra con velocidades en el rango de los MHz. En este trabajo utilizamos como modulación una señal cuadrada de 20 kHz. Los pulsos de Ti:Za se acoplan a

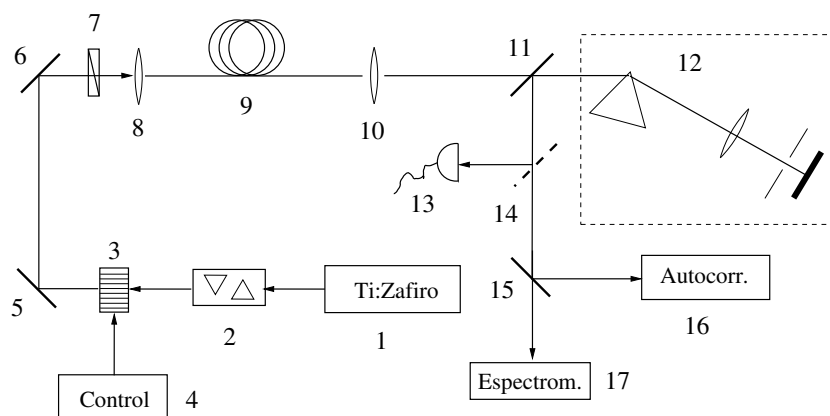


Figura 2.2.: Diagrama del arreglo experimental utilizado para generar y caracterizar pulsos sintonizables utilizando una fibra de cristal fotónico. 1) Ti:Za, 2) compresor de prismas, 3) Modulador acusto óptico, 4) Controlador del AOM, 5-6) espejos, 7) polarizador, 8) lente, 9) PCF, 10) lente objetivo, 11) divisor de haz, 12) filtro espectral, 13) medidor de potencia, 14) espejo móvil, 15) divisor de haz, 16) autocorrelador, 17) Espectrómetro.

una PCF de 75 cm de longitud (modelo NL-2.3-790-02, Thorlabs) con una eficiencia del 54 % utilizando una lente de distancia focal de 2.75 mm y 0.17 de NA. El diámetro del modo acoplado en la fibra es de 1.6 μm . En la Tabla 2.1 se presentan los parámetros característicos de la fibra.

La luz que sale de la PCF es colectada y colimada con una lente objetivo y enviada a un filtro espectral con el cual se selecciona el rango de longitudes de onda en el que se quiere trabajar.

El módulo de caracterización se divide en tres partes que permiten medir la potencia acoplada en la fibra, medir el espectro y medir el ancho temporal de los pulsos. La medición de potencia se realiza con un medidor de potencia Field Master, Coherent. El espectro se mide con un analizador de espectro (OSA) Ando AQ6317 y con un espectrómetro Jarrell-Ash, cuyo detector es un fotodiodo de silicio (PDS100, Thorlabs Inc.). El fotodiodo limita el rango de detección a 1000 nm. La resolución del OSA es de 0.5 nm y la del espectrómetro es de 2 nm. El ancho temporal se mide con un autocorrelador interferométrico, armado sobre la mesa óptica, cuyo esque-

Parámetro	Valor
Cero de dispersión	790 nm
Tamaño del modo en la fibra	1.6 μm
Coefficiente no-lineal @ 830 nm	78 (W km) ⁻¹
β_2 @ 830 nm	-12.4 ps ² /km
Longitud	75 cm
NA @ 830 nm	2.4

Tabla 2.1.: Parámetros de la PCF NL-2.3-790-02, Thorlabs.

ma se muestra en la Fig.2.3. Los pulsos que se obtienen a la salida de la PCF son pulsos de baja potencia, $\lesssim 1$ mW de potencia media, razón por la cual se realiza una detección *lock-in* en el autocorrelador. La frecuencia de modulación de la intensidad del pulso es de 20 kHz y el tiempo de integración de 100 ms. El barrido del brazo móvil del autocorrelador se realiza con un motor piezoeléctrico (PicoMotor, Newport) y la detección de la posición con un LVDT. Con este esquema cada autocorrelación requiere un tiempo de medición de unos 20 minutos. En un trabajo reciente [Caldarola et al., 2011] hemos introducido una mejora, utilizando un *fast-scan* [Costantino et al., 2001] (generador de retardos ópticos rápidos con un ciclo de trabajo del 100 %), que permite realizar autocorrelaciones en tiempos de algunos microsegundos.

2.3.2. Resultados y discusión

Como se mencionó anteriormente, la formación de solitones en fibras ópticas puede ser entendida como la compensación entre los efectos SPM y GVD, cuando un pulso se propaga en la región de dispersión en la que β_2 es negativo. Cuando un pulso de Ti:Za se acopla en una PCF se forma un solitón de orden N , Ec.(2.26), que a lo largo de la fibra se va a ir fisionando [Husakou and Herrmann, 2001] en N solitones fundamentales. Estos solitones fundamentales van a generar, debido a los términos de dispersión de alto orden, radiación no solitónica en condición de *phase-matching* en longitudes de onda de la región visible. Dado que los solitones fundamentales tienen

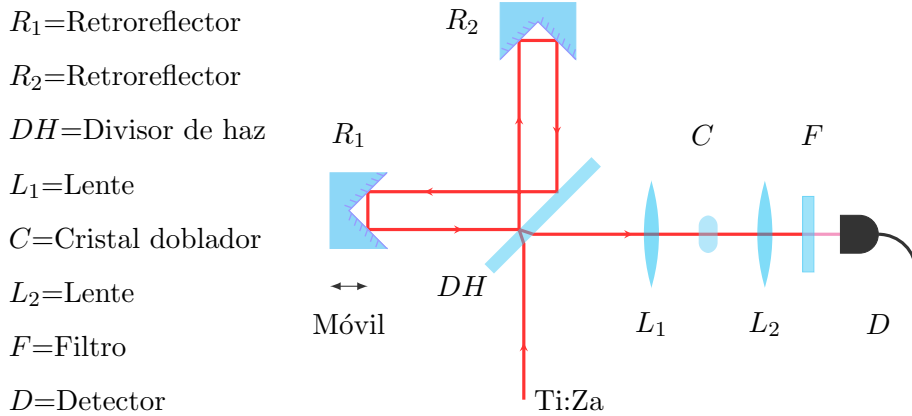


Figura 2.3.: Esquema del autocorrelador.

longitudes de onda central distintas, la NSR se va a generar también a distintas longitudes de onda. Además, el efecto RIFS hace que los solitones se corran en frecuencia a medida que recorren la PCF. Para baja potencia acoplada en la PCF estos efectos son los responsables de la generación de un espectro complejo de picos a la salida de la fibra. Para niveles de potencia suficiente, la composición de todos estos efectos genera un espectro supercontinuo.

La evolución del espectro de salida en función de la potencia acoplada en la fibra, desde 1 mW hasta 20 mW se muestra en la Fig.2.4. Allí se distinguen tres regiones, la línea de bombeo en 830 nm, las ramas solitónicas a longitudes de onda mayor, y las ramas de radiación no-solitónica a longitudes de onda menores [Herrmann et al., 2002]. Para el rango de potencias mencionado se puede observar que el rango de sintonizabilidad del solitón (la rama más infrarroja) va desde 850 nm hasta 1100 nm. Rangos de sintonizabilidad mayores se pueden alcanzar con mayor potencia acoplada [Masip, 2006].

En este capítulo se presentan mediciones espectrales y de autocorrelación para el régimen de baja potencia acoplada, ≤ 10 mW. Específicamente se muestran resultados

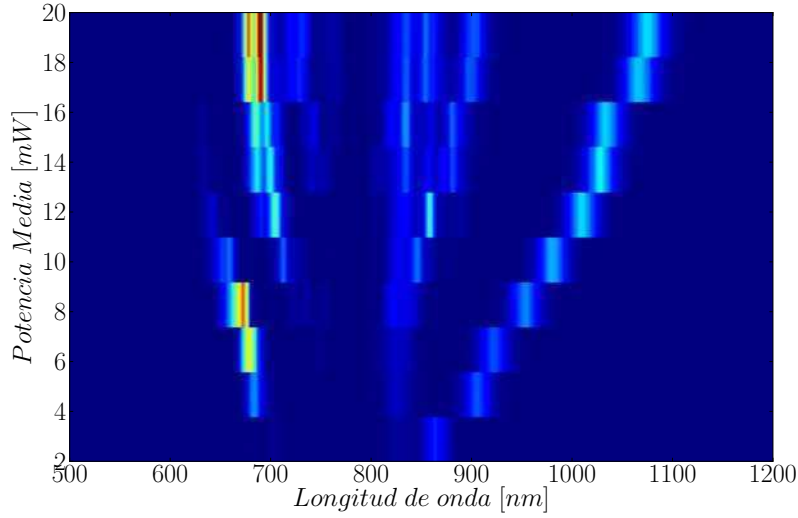


Figura 2.4.: Evolución del espectro en función de la potencia media acoplada en la fibra

Potencia	λ_0	$\Delta\lambda$	$\pm\delta\lambda$	Δt	$\pm\delta t$
4 mW	882 nm	21 nm	4 nm	44 fs	2 fs
6 mW	925 nm	23 nm	4 nm	42 fs	2 fs
10 mW	962 nm	18 nm	4 nm	41 fs	2 fs

Tabla 2.2.: Parámetros medidos del solitón para distintas potencias acopladas.

para tres potencias: 4 mW, 6 mW y 10 mW. Estas son tres potencias representativas del intervalo para el cual hay sólo un solitón fisionado del bombeo. Como puede verse en la Fig.2.4, para potencias mayores a 10 mW comienzan a desprenderse más ramas solitónicas. Una vez seleccionada la rama solitónica con el filtro espectral, la potencia media medida para el solitón, para cada una de las tres potencias mencionadas, fué de 1 mW.

En la tabla 2.2 se presentan, para cada una de las potencias elegidas, los valores de longitud de onda central, λ_0 , ancho espectral ($\Delta\lambda$, FWHM) y ancho temporal (Δt , FWHM) del solitón seleccionado. En la Fig.2.5 se muestran los espectros y las autocorrelaciones medidos. Cabe destacar que si bien estas fuentes de

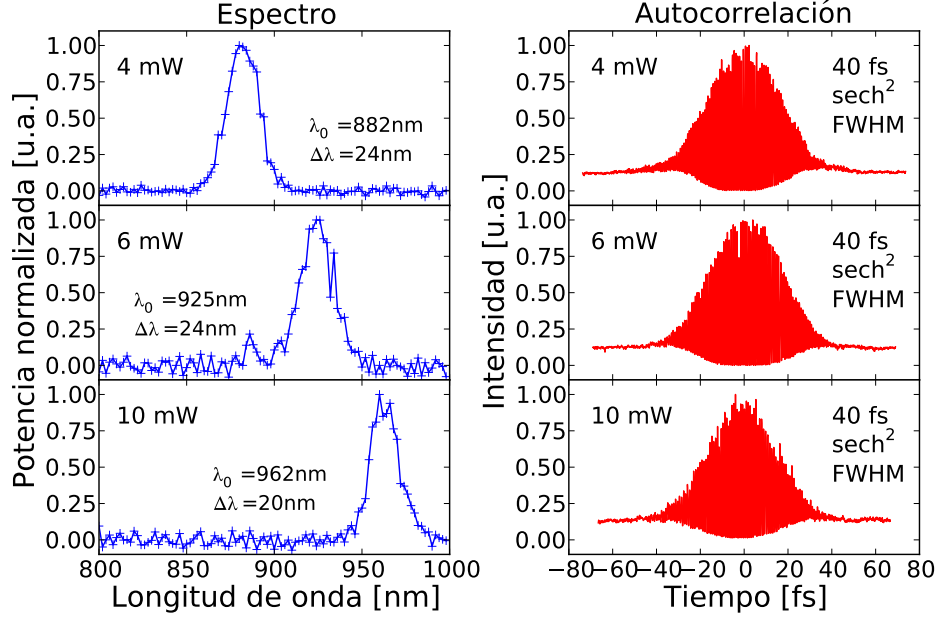


Figura 2.5.: Espectro y autocorrelación del solitón filtrado (normalizadas en intensidad) medidos para 4 mW, 6 mW y 10 mW de potencia media acoplada.

luz habían sido exploradas en la literatura, los resultados aquí presentados constituyen la primera medición completa de todos los parámetros relevantes del pulso solitónico[Masip et al., 2009a].

Para comparar los resultados experimentales con la teoría, resolvimos numéricamente la Ec.(2.23), utilizando, según la referencia [Agrawal, 2001], que $R(t) = (1 - f_R)\delta(t) + f_R h_R(t)$, que es la función de respuesta Raman, siendo $f_R = 0,18$ representa la contribución fraccional de la respuesta Raman retrasada y donde $h_R = (\tau_1^2 + \tau_2^2)/(\tau_1\tau_2^2)\exp(-t/\tau_2)\sin(t/\tau_1)$, con parámetros $\tau_1 = 12,2$ fs y $\tau_2 = 32$ para sílice.

Para la resolución numérica de la Ec.(2.23) se utilizó un método del tipo *Split-Step Fourier*, junto con uno de Runge-Kutta de orden 4 para realizar la integración temporal del término Raman. Se utilizaron 2^{14} puntos para describir el campo eléctrico en una ventana temporal de 8 ps. Esto hace que se tenga un intervalo temporal de $dt \sim 4$ fs y una ventana espectral de $1/dt \sim 256$ THz [Rieznik,].

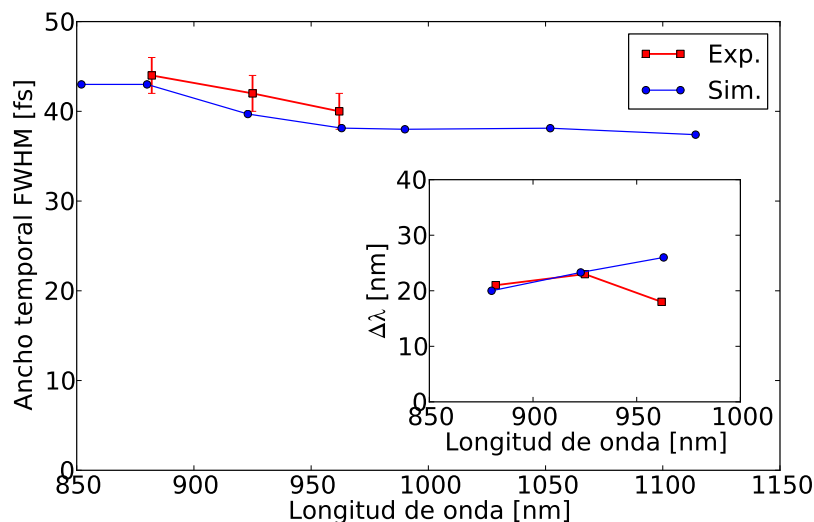


Figura 2.6.: Mediciones (cuadrados) y simulaciones (círculos) del ancho temporal del solitón filtrado en función de la longitud de onda central. En la inserción se grafican los anchos espectrales en función de la longitud de onda central.

Los resultados de las simulaciones juntamente con resultados experimentales se muestran en la Fig.2.6, en donde se grafica el ancho temporal del solitón filtrado en función de su longitud de onda central. El acuerdo entre las simulaciones y las mediciones es notable. Como se mencionó anteriormente las mediciones están limitadas por la respuesta del fotodiodo del espectrómetro, mientras que las simulaciones predicen que el ancho temporal del solitón se mantiene constante para longitudes de onda mayores. En la Fig.2.6 se puede ver también un inserto en la figura en la que se grafican los anchos espectrales en función de la longitud de onda central del solitón. En ella se ve también un muy buen acuerdo entre los datos y la simulación.

Como extensión de este trabajo, en [Caldarola et al., 2011] presentamos nuevas mediciones del ancho temporal del solitón infrarrojo (a salida de la PCF) en función de su longitud de onda, desde los 950 nm hasta 1150 nm. Las autocorrelaciones medidas para esas longitudes de onda muestran que el ancho temporal del solitón se mantiene constante. Como se mencionó, para realizar las mediciones extendidas se

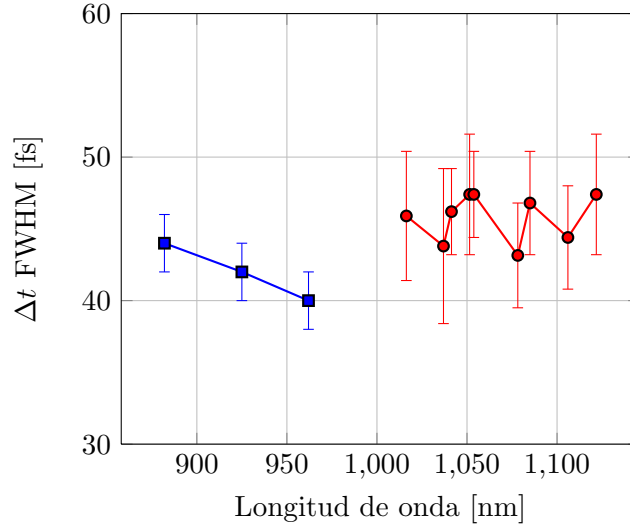


Figura 2.7.: Ancho temporal del solitón sintonizable a la salida de la PCF. Los puntos cuadrados corresponden a la medición mostrada en la Fig.2.6(técnica *lock-in*), y los puntos redondos corresponden a las mediciones extendidas (usando un *fast-scan*).

utilizó un autocorrelador interferométrico con un *fast-scan*, lo que permite realizar mediciones de autocorrelación mucho más rápidas que las mencionadas anteriormente (unas 10^6 veces más rápido), siempre que haya potencia suficiente (en el caso de las mediciones presentadas arriba, la potencia del solitón es muy baja y no es posible medir autocorrelaciones utilizando el *fast-scan*).

Las mediciones extendidas, con el uso del *fast-scan*, se muestra en la Fig.2.7. Otro resultado que mostramos en [Caldarola et al., 2011] tiene que ver con la robustez de la fuente solitónica sintonizable respecto del barrido en frecuencia, o *chirp*, con el que llegan los pulsos del Ti:Za a la PCF. Demostramos que el ancho temporal de los pulsos no depende de la dispersión con la que entran los pulsos a la PCF y, por lo tanto, no es necesaria la utilización del compresor de prismas para precompensar la dispersión.

Desde el punto de vista de la sintonizabilidad, esta fuente de luz solitónica ofrece la posibilidad de cambiar de longitud de onda muy rápidamente. Esto es posible ya

que la selección de longitud de onda del solitón se realiza cambiando la potencia acoplada con un AOM. Por ejemplo, si queremos que el solitón que sale de la PCF alterne su longitud de onda central entre dos valores definidos, podemos utilizar como señal moduladora una señal cuadrada con valor medio no nulo, en donde los dos niveles de la cuadrada se ajustaran de acuerdo a las longitudes de onda deseadas. Más aún, la selección entre las dos longitudes de onda se puede hacer tan rápida como uno desee, teniendo como única limitación la frecuencia de repetición de los pulsos del Ti:Za. Esto abre la posibilidad de construir espectros de forma arbitraria en el infrarrojo cercano.

2.4. Fuente de luz blanca

Como se mencionó en la introducción, la segunda fuente de luz construida en base a una fibra de cristal fotónico es una fuente de luz blanca. A la generación de luz blanca se la menciona a menudo en la literatura como generación de supercontinuo [Ranka et al., 2000]. La generación de supercontinuo se produce para altas potencias de acople, como puede observarse en la Fig.2.4. Las características principales de las fuentes basadas en fibras PCF son el ancho espectral (más de una octava en el visible), la potencia y la coherencia espacial, que permite manipular el haz blanco de la misma forma que se hace con cualquier láser (algo que no se puede hacer con una lámpara).

La idea de utilizar las PCF para generar supercontinuo es la de aprovechar al máximo todas las no-linealidades para que se generen componentes en todas las longitudes de onda del espectro visible e infrarrojo cercano cuando se la bombea con un láser pulsado. La manera más efectiva de lograr esto, es utilizar una PCF muy no-lineal, que tenga el cero de dispersión alrededor de 800 nm (por debajo de la longitud de onda de bombeo) y que mantenga la polarización. Es por esto que el dispositivo utilizado para generar luz blanca se armó con una PCF Femtowhite 800, de Crystal-Fiber, cuyas características principales se muestran en la Tabla 2.3. El dispositivo tiene soldada en cada uno de sus extremos una fibra estándar para facilitar el acoplamiento del láser de bombeo y está contenida en una carcasa metálica

Parámetro	Valor
Cero de dispersión	750 nm
Tamaño del modo en la fibra	1.6 μm
Coefficiente no-lineal γ @ 780 nm	95 (W km) ⁻¹
β_2 @ 780 nm	20 ps/km/nm
Longitud	12 cm
NA @ 780 nm	0.38

Tabla 2.3.: Parámetros de la fibra Femtowhite 800.

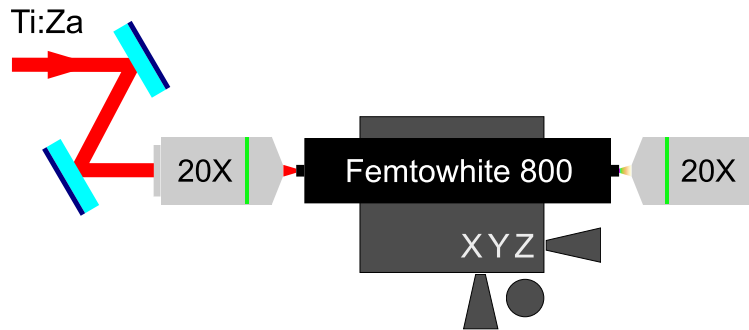


Figura 2.8.: Esquema del arreglo experimental utilizado para la generación de luz blanca.

que le otorga robustez mecánica al conjunto.

En la Fig.2.8 se muestra un esquema del arreglo experimental utilizado para la generación de supercontinuo. La salida del Ti:Za se enfoca directamente en la fibra utilizando una lente objetivo 20X-0.4NA-Olympus. La luz que sale de la fibra es colectada con una lente objetivo 20X-0.4NA-Ach-Olympus.

En la Fig.2.9 se grafica el espectro típico a la salida del sistema. Con esta fuente de luz se realizaron todos los experimentos de medición de espectro de estructuras plasmónicas que se presentan en el capítulo 4.

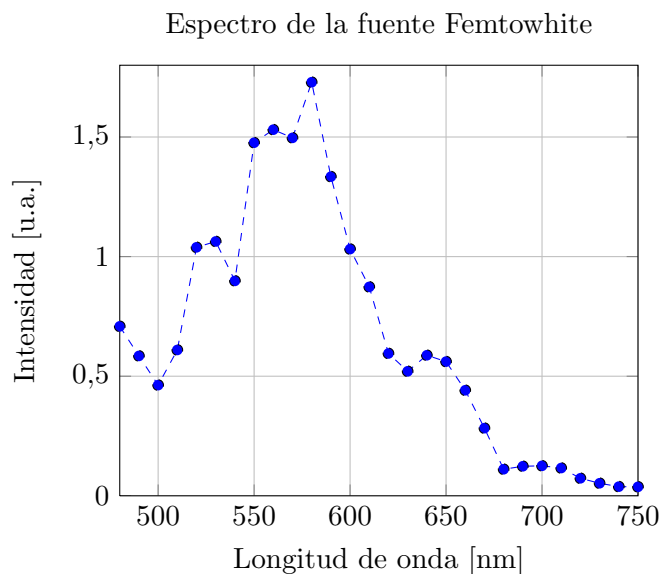


Figura 2.9.: Espectro típico a la salida del sistema generador de supercontinuo basado en una PCF Femtowhite 800.

2.5. Conclusiones y perspectivas

Se construyó una fuente de pulsos ultracortos sintonizables desde 850 a 1250 nm utilizando una fibra de cristal fotónico y un láser pulsado de Ti:Za como bombeo. Se caracterizó la fuente midiendo el espectro, el ancho temporal y la potencia en todo el rango de sintonizabilidad y se mostró que es independiente del *chirp* de entrada de los pulsos de bombeo. El ancho temporal de los pulsos obtenidos es constante, ~ 40 fs, en todo el rango de sintonizabilidad. El parámetro de control en la sintonización es la potencia acoplada en la fibra, que se selecciona utilizando un modulador acusto-óptico, lo que permite seleccionar la longitud de onda de trabajo a velocidades sólo limitadas por la frecuencia de repetición del láser de bombeo.

También hemos presentado una fuente de luz blanca basada en una fibra de cristal fotónico. Las características principales de esta fuente es el ancho espectral, de ~ 450 -750 nm, la potencia y la coherencia espacial que poseen. Con esta fuente de luz se realizaron los espectros de estructuras plasmónicas que se presentarán en el Cap.4.

Capítulo 3.

Microscopio AFM

En este capítulo se presenta el microscopio de fuerza atómica (AFM) construido como parte del microscopio combinado.

El AFM es un microscopio de barrido en el que se utiliza como sensor un fleje con una punta que toma contacto con la muestra. Entre la punta y la muestra hay fuerzas de interacción de corto alcance (distancias de separación menores al nanometro), como la fuerza de van der Waals y la fuerza electrostática, y fuerzas de largo alcance (distancias de separación de algunas decenas de nanometros), como la fuerza producida por la presencia de una capa de agua sobre la muestra. Cuando el sensor es barrido en contacto sobre la muestra, el fleje se va a flexionar siguiendo la topografía. Esta flexión es la que se mide y de la cual se obtiene la información topográfica. La técnica más extendida para medir la flexión del sensor es medir la reflexión de un láser que se hace incidir sobre el fleje.

En las secciones que siguen se realiza una descripción más detallada del funcionamiento del AFM, del microscopio construido y de las imágenes obtenidas con el mismo.

3.1. Nociones de microscopía AFM

3.1.1. Modos de operación

Modo contacto y modo intermitente

Los sensores de fuerza de un AFM están compuestos por un fleje, en cuyo extremo se ubica la punta o sonda, que se barre sobre la muestra a estudiar. El AFM tiene dos modos de operación principales, el modo contacto y el modo intermitente. En el modo contacto el sensor se desplaza sobre la muestra a separaciones del orden del Angstrom, intermediando fuerzas atómicas, y la señal que se mide es la flexión del sensor. En el modo intermitente el sensor es forzado y puesto a oscilar y luego es aproximado a la muestra. En este caso se realiza una detección *lock-in*, la señal sensada es la amplitud de oscilación del sensor de fuerza.

Cada modo de operación tiene sus ventajas respecto del otro. El modo contacto requiere menos instrumentación y es el modo en el que se alcanzan las mayores resoluciones. El modo intermitente es de utilidad cuando las muestras son muy blandas, ya que en contacto se corre el riesgo de arrastrar la muestra. Los dos modos se pueden utilizar bajo líquido, es decir con la muestra y el sensor inmersos en un *buffer*, lo cual lo hace especialmente atractivo para aplicaciones en biología.

Modos no-topográficos

Existen modos de operación en los que se miden propiedades como la fuerza de fricción, fuerzas magnéticas, fuerzas eléctricas, corrientes eléctricas y más. En estos casos la muestra puede ser topográficamente plana, sin embargo puede presentar contraste cuando se mide alguna de las magnitudes nombradas.

3.1.2. Curvas de fuerza

Las curvas de fuerza en función de la distancia (extensión de la unidad de traslación) son generadas en un punto de la muestra, sin realizar el barrido. Se generan a partir de un procedimiento que comienza con el sensor alejado de la muestra, luego se lo acerca a la muestra hasta producir el contacto y luego se lo retira hacia la

posición inicial. En la Fig.3.1 se muestra una curva de fuerza en la cual se detallan las distintas etapas del procedimiento: en la posición A el sensor está alejado de la muestra, en el B se produce un salto pequeño hacia el contacto debido a las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra, en el tramo C hay contacto y el fleje se flexiona según $F = -kz$, en D sigue habiendo contacto por un efecto de adhesión pero se están separando el sensor y la muestra, y finalmente en E se produce un salto abrupto producto de la ruptura de la interacción entre el sensor y la muestra, para retornar al punto A. Las curvas de fuerza se utilizan para determinar la fuerza de trabajo, *setpoint*, en el modo contacto.

La capacidad del AFM para registrar fuerzas dió origen a una técnica complementaria, la espectroscopía de fuerza (FS) [Hinterdorfer and Dufrêne, 2006]. La FS consiste en la obtención de curvas de fuerza en distintos puntos de la muestra, que permiten realizar un mapeo de propiedades tales como la elasticidad, adherencia y densidad de carga, entre otras. De esta forma se puede obtener un mapeo tridimensional de la fuerza para cada punto medido, con alta resolución espacial. Una manera de obtener los mapas de fuerza es utilizando sensores modificados químicamente con moléculas de interés. Por ejemplo se puede utilizar un ligando específico y obtener un mapa que indique la presencia y distribución de receptores en la superficie de un sustrato, como puede ser una célula.

3.1.3. Sensores de fuerza

Cada modo de operación, dependiendo de las condiciones en las cuales se mira la muestra, requiere un tipo especial de sensor de fuerza. Típicamente, se utilizan sensores blandos para contacto y sensores duros para el modo intermitente.

Para el modo contacto, en seco y bajo líquido, se utilizan sensores de Nitruro de Silicio. Típicamente consisten en un fleje en forma de “V” y una punta afilada en el vértice. Las características mecánicas del fleje son determinantes para la resolución y la sensibilidad del sensor. En la Tabla 3.1 se muestran las características de los sensores utilizados en este trabajo. En la Fig.3.2(a) se muestra un esquema de sensores típicos de Si_3N_4 , donde vemos que por cada sustrato hay cuatro sensores,

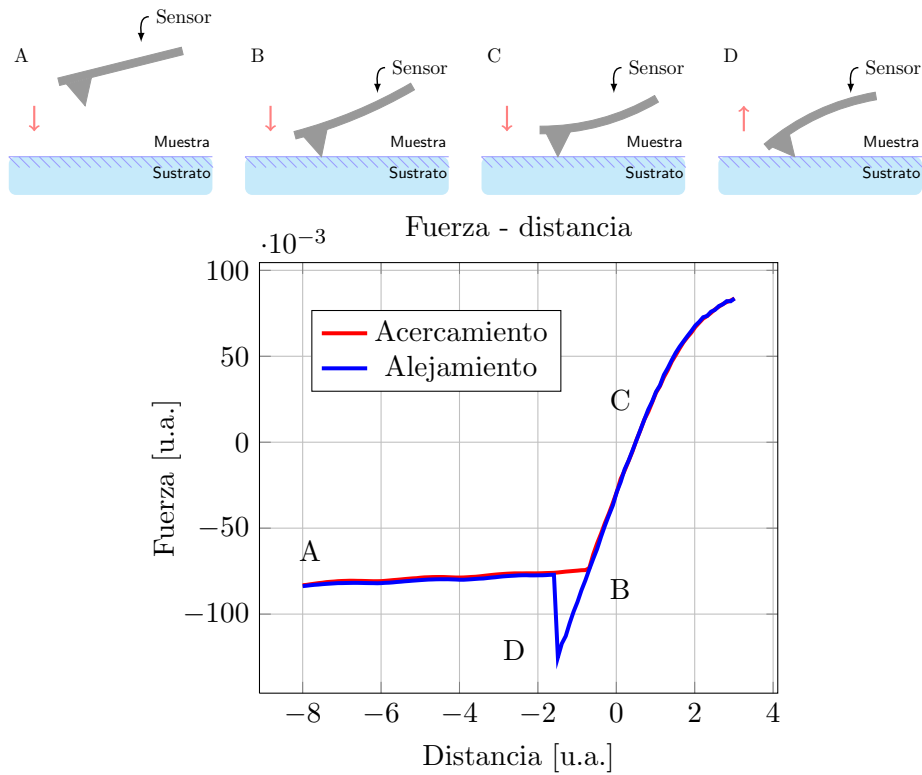


Figura 3.1.: Esquema de la medición de curvas de fuerza.

cada uno con características mecánicas diferentes (varía el ancho y el largo del fleje). La elección del sensor a utilizar depende de la muestra a observar. En todas las imágenes AFM de esta tesis se utilizó el sensor más blando, el de fleje más largo y más angosto.

Para el modo intermitente en seco se suelen utilizar sensores de silicio. Estos sensores son mucho más rígidos que los descritos arriba y por lo tanto tienen una frecuencia de resonancia mucho más alta. En el Tabla 3.1.3 se muestran las características principales y en la Fig.3.2(b) se puede ver un esquema del sustrato y el sensor. Alternativamente, se pueden utilizar los sensores de contacto para tomar imágenes en modo intermitente, como se hizo en este trabajo (utilizando los sensores más blandos).

Parámetro	Valor
Constante elástica	0.06 - 0.12 - 0.32 - 0.58 N/m
Frecuencia de resonancia	10-90 kHz
Radio de curvatura de la punta	20 - 60 nm
Longitud del fleje	100 y 200 μm
Recubrimiento reflectivo	Oro
Ángulos de la punta	35°

Tabla 3.1.: Características de los sensores de nitruro de silicio. Cada sustrato contiene 4 tipos de sensores.

Parámetro	Valor
Constante elástica	20-100 N/m
Frecuencia de resonancia	100-300 kHz
Radio de curvatura de la punta	5-10 nm
Longitud del fleje	130 μm
Recubrimiento reflectivo	sin recubrimiento
Ángulos de la punta	25°y 10°

Tabla 3.2.: Características de los sensores de silicio. Cada sustrato contiene 4 tipos de sensores.

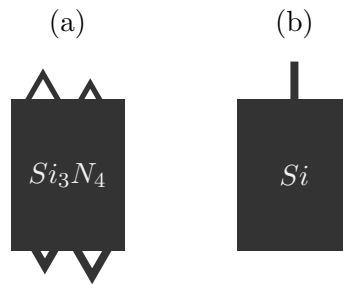


Figura 3.2.: Esquema de los sustratos y sensores de nitruro de silicio (a) y de silicio (b).

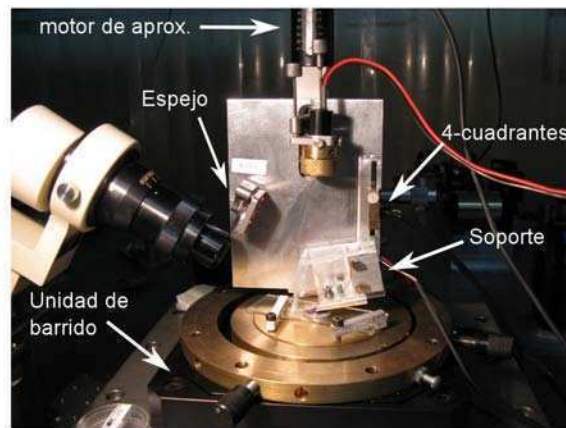


Figura 3.3.: Foto del cabezal AFM construido en el laboratorio. Se puede observar la unidad de barrido, el motor de aproximación, el láser, el soporte del sensor y el detector. El microscopio está montado sobre una mesa óptica.

3.2. EI AFM-LEC

El microscopio de fuerza atómica que se describe en esta sección fue diseñado en el Laboratorio de Electrónica Cuántica. El cabezal AFM fue fabricado utilizando las facilidades del laboratorio y del taller del Departamento de Física. En la Fig.3.3 se muestra una foto del cabezal montado sobre la mesa óptica, en la que se pueden ver el láser, el soporte de los sensores, el espejo, el detector 4-cuadrantes y la unidad de barrido.

3.2.1. Detección de la señal topográfica

En la Fig.3.4(A) se muestra un esquema del microscopio AFM. El microscopio está compuesto por un sensor de fuerza (un fleje o *cantilever* con una punta en el extremo) cuya cara posterior está metalizada y sobre la que se enfoca un láser. La reflexión en el sensor es dirigida hacia un sensor de posición, un detector de cuatro cuadrantes que consiste esencialmente en un fotodiodo dividido en cuatro partes, Fig.3.4(B). La flexión del sensor de fuerza debido a la interacción con la muestra, produce un desplazamiento del haz sobre el 4-cuadrantes. La señal de flexión vertical, es decir la señal topográfica, se obtiene haciendo el siguiente cálculo entre las tensiones medidas por cada parte del detector,

$$V_{sig} = \frac{(V_A + V_B) - (V_C + V_D)}{V_A + V_B + V_C + V_D}. \quad (3.1)$$

En el modo de contacto intermitente la señal de la Ec.(3.1) es enviada a un amplificador *lock-in* y luego a la electrónica de control. Para determinar la frecuencia de trabajo para el modo intermitente se mide la curva de resonancia del sensor realizando un barrido en frecuencias midiendo con el *lock-in* la señal V_{sig} .

3.2.2. Lazo de control

Para poder realizar mediciones calibradas de la topografía de la muestra es necesario incluir una unidad de traslación que corrija la posición de la muestra, a medida que se realiza el barrido, de forma tal de mantener constante la señal calculada del detector. De esta manera, la señal de control de la unidad de traslación es la que aportará la información de la topografía. La manera de implementar esto es utilizar una electrónica de control que reciba la señal del detector, que la compare con un *set-point* pre-establecido por el usuario y luego envíe la señal de control a la unidad de traslación para que corrija la posición de manera que la señal del detector vuelva a ser igual a la del *setpoint*. Es decir, lo que se quiere es mantener la señal error, $V_{error} = V_{sig} - V_{setpoint}$, igual a 0.

La electrónica de control utilizada en este trabajo implementa un lazo de control del tipo Proporcional-Integral, en el cual la señal de control se corrige a partir de la

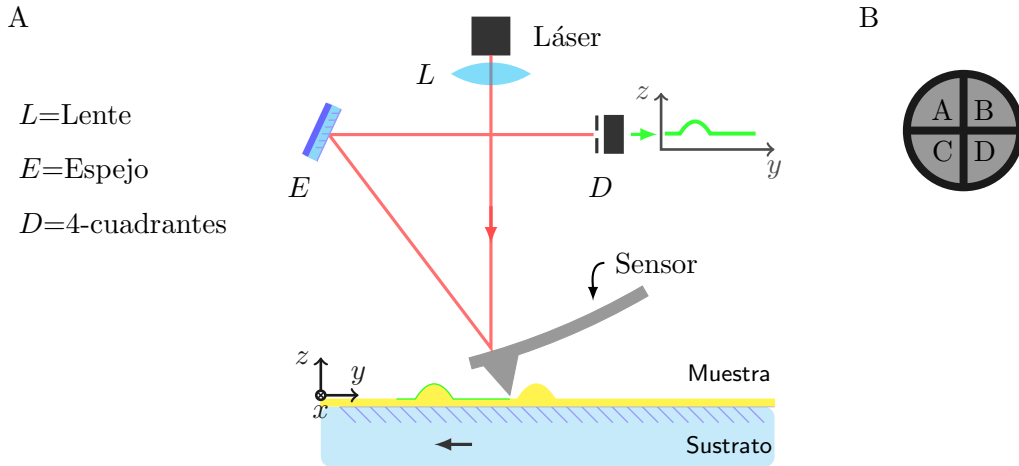


Figura 3.4.: (a) Esquema del cabezal del AFM. Un láser es enfocado sobre un sensor de fuerza, y luego es dirigido hacia un detector de cuatro cuadrantes utilizando un espejo. A medida que el sensor se desplaza sobre la muestra, se va flexionando siguiendo la topografía. Las flexiones se traducen en un desplazamiento del haz sobre el detector y por consiguiente en diferencias de tensión entre los cuadrantes. (b) Esquema del detector de 4 cuadrantes.

señal error multiplicada por una constante k_P , parte proporcional, y es sumada a la suma de los errores anteriores multiplicados por una constante k_I , parte integral:

$$V_{lazo}(t_{n+1}) = k_P V_{error}(t_n) + k_I \int_0^{t_n} V_{error}(t_n) dt \quad (3.2)$$

El valor de la señal V_{lazo} es traducida entonces a un valor de señal de control de la posición. El lazo se cierra cuando se vuelve a leer la señal del detector y se repite el procedimiento.

3.2.3. Unidad de barrido

Para producir el desplazamiento relativo entre la punta y la muestra existen distintos sistemas de barridos. Los dos más utilizados son los que están diseñados con piezoeléctricos tubulares y los que están diseñados con piezoeléctricos lineales. En

ambos casos se obtiene resolución subnanométrica. Los sistemas con piezoeléctricos tubulares se encuentran en la mayoría de los microscopio comerciales, en los que se han implementado sistemas en los que se mueve el sensor respecto de la muestra y en los que se mueve la muestra y el sensor está quieto. Los sistemas con piezoeléctricos lineales se encuentran por lo general en los microscopios desarrollados en laboratorios de investigación, como es el caso de este trabajo. Estas unidades de traslación son, en la mayoría de los casos, comerciales.

La unidad de barrido del microscopio construido es una platina con piezoeléctricos lineales, modelo 517.3CL, Physik Instrumente (PI) [Physik Instrumente,], controlado por una unidad programable E-516 y amplificadores E-509, también de PI. La unidad cuenta con detectores capacitivos que permiten operar a lazo cerrado (en el controlador de la unidad) y controlar la posición calibrada por el fabricante. La unidad produce desplazamientos lineales de 100 μm x 100 μm en el plano de la muestra (que llamaremos XY) y de 20 μm en la dirección perpendicular al plano XY (que llamaremos Z), con resolución subnanométrica. El movimiento de los piezos se puede comandar utilizando una interfaz GPIB [GPIB,] o utilizando las entradas de control por tensión, de 0 a 10 V.

La unidad de control del microscopio, aquella encargada de controlar el lazo de realimentación mencionado en 3.1 y 3.2.2, es una electrónica diseñada para microscopías de barrido en la que está implementado el control de unidades de barrido y el lazo de control, modelo SPM100+AFM100, fabricada por RHK Technologies [RHK,]. El programa de control del SPM100, XPMPPro 2.0 [RHK,], permite realizar los barridos, interpretar y responder a las mediciones del 4-cuadrantes, controlar la posición en Z, medir curvas de fuerza, realizar mediciones espectroscópicas utilizando entradas auxiliares, entre otras funciones. Una característica importante del SPM100 es que posee entradas auxiliares que permiten realizar mediciones adicionales a medida que se realiza el barrido o se realizan curvas de fuerza. Esto es de particular interés en este trabajo, ya que se van a realizar mediciones ópticas sincronizadas con el barrido.

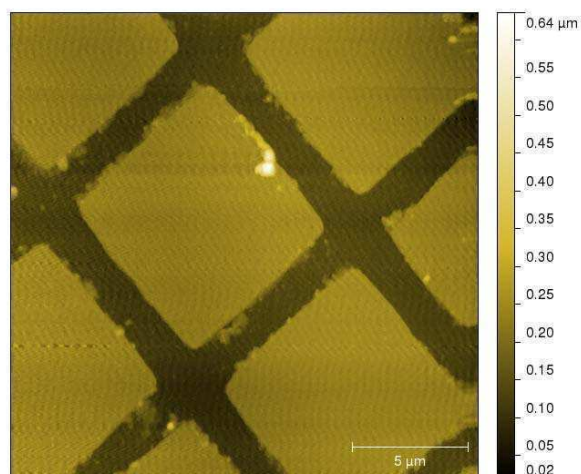


Figura 3.5.: Imagen AFM en modo contacto de una grilla de calibración de Si con período de 10 μm y una altura de 100 nm.

3.3. Imágenes de alta resolución

Presentamos en esta sección imágenes obtenidas con el microscopio AFM construido. Las imágenes obtenidas muestran que el microscopio tiene alta resolución y estabilidad. Cabe destacar que todo el AFM está montado sobre una plataforma a 12 cm de altura de la mesa óptica, para permitir el posterior acople con un microscopio óptico con epi-iluminación. Se obtuvieron imágenes de alta resolución tanto en el modo contacto como intermitente.

En la Fig.3.5 se muestra una de las primeras imágenes adquiridas con el microscopio AFM construido. La imagen corresponde a una grilla de calibración de Si que consiste en islas cuadradas distribuidas en una red de 10 μm de período en las dos direcciones del plano, con una altura de 100 nm. La imagen está tomada en modo contacto, utilizando un sensor de nitruro de silicio.

La Fig.3.6 muestra una imagen AFM adquirida en modo contacto intermitente de una grilla que consiste en un arreglo periódico de agujas de silicio de 700 nm de alto. Esta grilla es utilizada generalmente para conocer la forma de la punta del sensor de fuerza, y poder determinar si es aguda, o si tiene alguna cuerpo extraño adherido

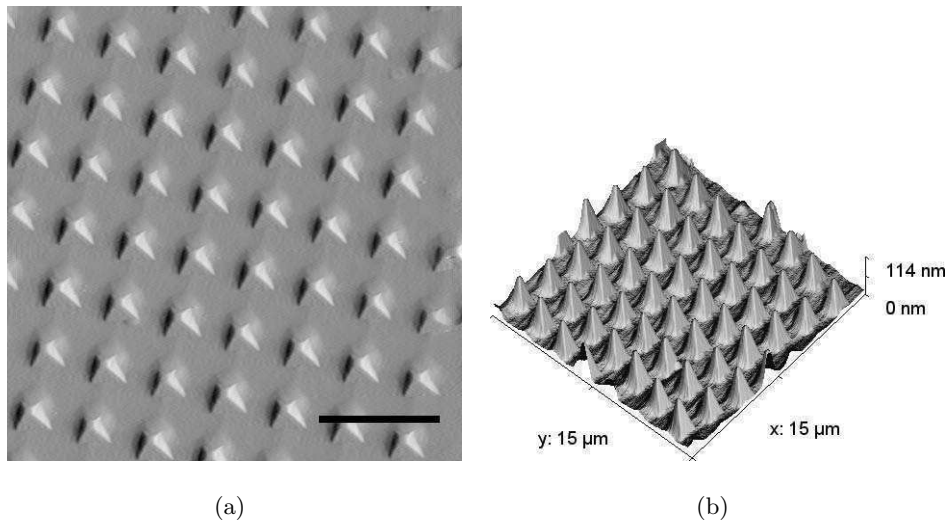
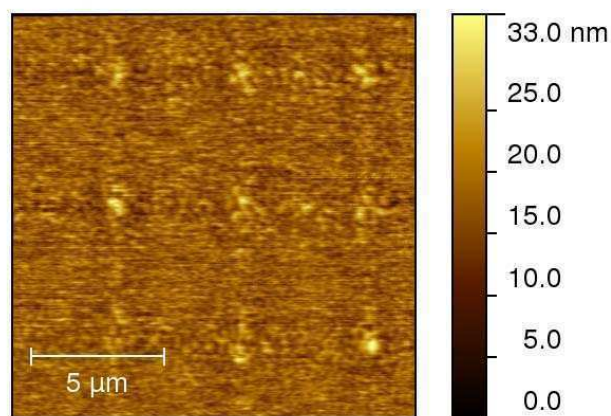


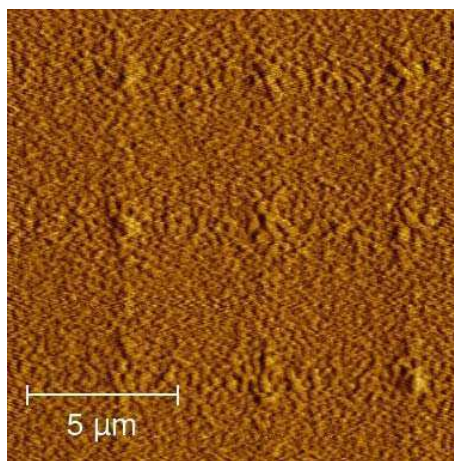
Figura 3.6.: Imágenes AFM de una grilla de agujas de silicio dispuestas en un arreglo periódico. En (a) se muestra una imagen obtenida utilizando la señal error del lazo de control. En (b) se muestra la imagen de topografía, en la que se pueden observar las agujas. La longitud de la barra es de 4 μm.

en su ápice. Esto se debe a que las imágenes de AFM están formadas a partir de la convolución espacial entre la punta del sensor y la muestra. Imaginemos que el sensor con el que trabajamos tiene una punta muy ancha, entonces cualquier detalle de la muestra se va a comportar como un objeto puntual en comparación, por lo que la imagen que se va a observar va a ser una imagen en la que aparezca de manera repetida la forma de la punta del sensor. Este efecto es uno de los *artifacts* más comunes de la microscopía AFM, en muchos casos esto lleva a que no se interpreten correctamente las imágenes de AFM. En la Fig.3.6 se puede ver que aparece repetido un mismo patrón, el cual corresponde a la forma piramidal de la punta del sensor. Dada la simetría de las agujas de silicio, la punta del sensor se ve siempre con la misma orientación.

También se obtuvieron imágenes de grillas de resina polimerizada, fabricadas por litografía óptica [Kunik et al., 2010]. En la Fig.3.7 se puede ver la grilla, con un



(a)



(b)

Figura 3.7.: Imágenes de una grilla de resina polimerizada fabricada utilizando una técnica de litografía óptica. (a) Imagen de topografía, se pueden ver detalles menores a 10 nm de altura. (b) Imagen de la misma región utilizando la señal error.

espaciado entre líneas de 10 μm y una altura no mayor a 30 nm.

Podemos observar en la Fig.3.8 un perfil de topografía de un detalle de la grilla de polímero presentada en la Fig.3.7. Se midió la altura del detalle obteniendo un valor de 7 nm.

Esta imágenes muestran las capacidades básicas del microscopio AFM construido

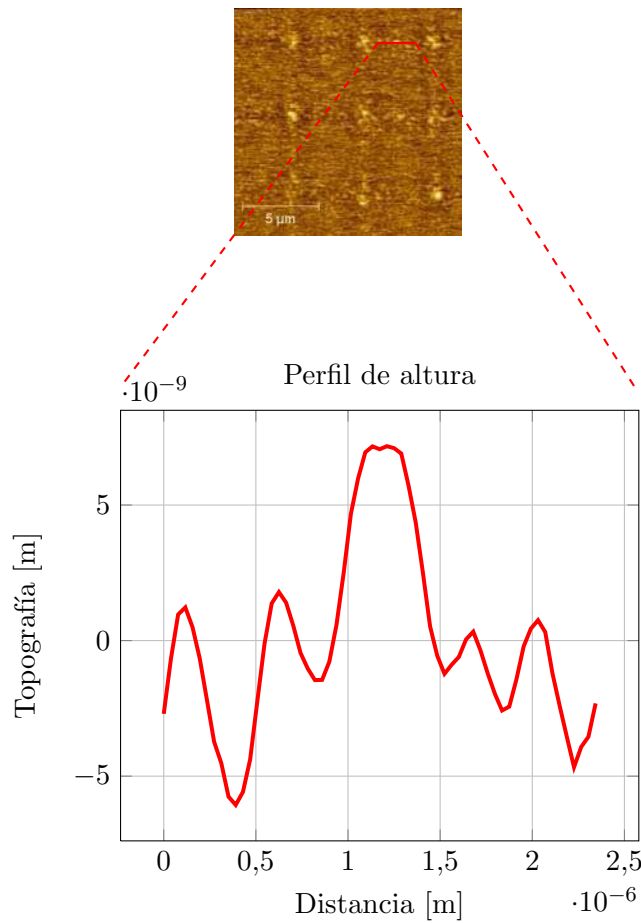


Figura 3.8.: Perfil de topografía de un detalle de la grilla de polímero de la Fig.3.7.

Se observa que la altura del detalle es de 7 nm.

en este trabajo y sirven como validación de su correcto funcionamiento.

3.4. Conclusiones

En este capítulo hemos presentado la construcción de un microscopio de fuerza atómica, que funciona en los modos contacto y contacto intermitente. El microscopio, construido sobre una plataforma elevada respecto de la mesa óptica, muestra imágenes topográficas de alta resolución en el orden de los 20 nm. La resolución y la estabilidad demostradas son condiciones fundamentales para las aplicaciones que

se mostrarán en los siguientes capítulos.

Capítulo 4.

Microscopia óptica espectral.

Aplicaciones a la plasmónica.

En este capítulo se presentan mediciones ópticas espectrales de partícula única de nanopartículas de oro, microesferas de sílice y microesferas de sílice decoradas con nanopartículas de oro. Estas mediciones se llevaron a cabo utilizando una plataforma de microscopía óptica de barrido desarrollada para tal fin, y que se describirá en detalle en las primeras secciones.

4.1. Descripción general del equipo

En la Fig.4.1 se muestra un esquema del microscopio óptico desarrollado en este trabajo. El microscopio cuenta tres partes principales: iluminación, sistema de enfoque y formación de imagen y detección. Cada una de las partes se esquematiza en los cuadros (1,2,3), (5-6) y (7-8) de la Fig.4.1 respectivamente. En las siguientes subsecciones se describe a cada una de las partes así como también los modos de operación del microscopio.

El microscopio fue desarrollado sobre una mesa antivibratoria óptica, y la altura de trabajo donde se encuentra la platina es de 12 cm, mucho menor que la altura de un microscopio óptico comercial, para asegurar la estabilidad mecánica.

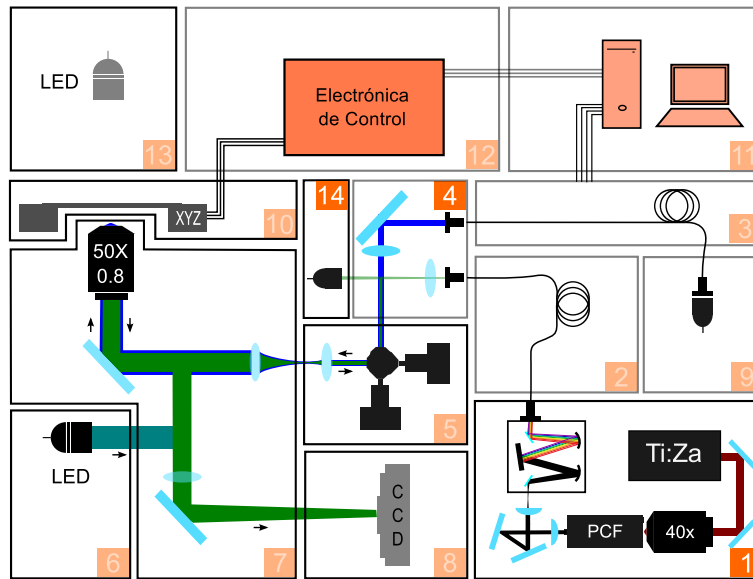


Figura 4.1.: Esquema del arreglo experimental: 1) fuentes de luz láser, Ti:Za y PCF, 2) y 3) fibras ópticas de entrada/salida, 4) puertos de entrada y salida, 5) unidad de barrido galvanométrico ó “galvos”, 6) puerto de epiluminación LED, 7) objetivo, 8) cámara CCD, 9) PMT, 10) unidad de traslación, 11) computadora, 12) electrónica de control, 13) transiluminación con LED, 14) fotodiodo de monitoreo.

4.1.1. Iluminación

Una de las fuentes de luz disponibles para este microscopio es la fuente de luz blanca basada en la fibra Femtowhite-800 descrita en 2.4. La luz de esta fuente es enviada a un monocromador con un par de espejos. La salida del monocromador se acopla a una fibra óptica monomodo que se conecta a un puerto de entrada del microscopio. El monocromador, con barrido automatizado, permite seleccionar la longitud de onda con la cual se ilumina la muestra (Fig.4.1-1), y el *core* de la fibra a la salida hace las veces de rendija seleccionando un ancho espectral de 2 nm.

Las otras fuentes de luz son dos diodos emisores de luz (LED). Una de ellas es una fuente construida en el laboratorio, que consta de un diodo de luz blanca de 5W (potencia eléctrica) acoplado a una fibra en una configuración de iluminación directa

o transiluminación (enfrentada a la lente objetivo). La segunda fuente LED emite luz centrada en el azul (480 nm), TK-LED AZUL, fabricada por Tolket SRL, que llega a la muestra en configuración epi, o sea del mismo lado que la lente objetivo, cuadro 6 de la Fig.4.1.

4.1.2. Detección

El microscopio cuenta con tres dispositivos de detección de luz. Uno es un fotodiodo de silicio, FDS100 fabricado por Thorlabs Inc., que permite medir la intensidad de luz que llega a la entrada del microscopio desde el monocromador, Fig.4.1-4. Otro dispositivo es una cámara CCD, Fig.4.1-8, Apogee Alta U2000 fabricada por Apogee Imaging Systems. Las características principales de esta cámara son la alta eficiencia cuántica, el bajo nivel de ruido y un chip CCD de 1600x1200 pixeles cuadrados de 7.4 μm de lado. El tercer dispositivo de detección es un fotomultiplicador, R928A fabricado por Hamamatsu, que permite un rango de detección que va desde 350 nm hasta 900 nm, Fig.4.1-9. El fotomultiplicador está conectado al cuerpo del microscopio por medio de una fibra óptica multimodo de 65 μm de diámetro del núcleo, M31L01 fabricada por Thorlabs, en la cual se enfoca la luz que llega de la muestra con una lente objetivo PLN10X fabricada por Olympus.

La adquisición de las señales medidas con los dispositivos descritos arriba se realiza con una computadora e interfaces. La señal del fotodiodo es enviada a un amplificador *lockin*, SR520 fabricado por Stanford Research, y luego a una placa de adquisición, DAQ PCI-6035E fabricada por National Instruments. La DAQ es controlada con un programa realizado en LabView 8.5 [Labview,]. La señal del fotomultiplicador es enviada a otro amplificador *lockin*, SR830 fabricado por Stanford Research, controlado por un programa realizado en LabView 8.5 a través del puerto GPIB. Además, la señal de salida del *lockin* del fotomultiplicador es enviada a una entrada auxiliar de la unidad de control SP100 (descrita en la Sec.3.2). La cámara CCD también se controla utilizando un programa realizado en LabView 8.5.

4.2. Modos de adquisición de imágenes del microscopio óptico espectral

Dependiendo de la combinación de la manera de iluminar la muestra, de la configuración del camino que realiza la luz hacia y desde la muestra y del detector que se utilice, se pueden distinguir tres modos de adquisición: campo brillante, fluorescencia *wide-field* y confocal, que se describen abajo.

4.2.1. Campo brillante

En este modo de operación se utiliza típicamente la transiluminación utilizando el LED blanco descrito en 4.1.1. Parte de la luz que atraviesa la muestra es colectada y colimada por una lente objetivo, 50X fabricada por Olympus, y luego enfocada en la CCD. De esta manera se logra formar una imagen de la muestra en la cámara CCD.

4.2.2. Fluorescencia *wide-field*

Este modo de operación se utiliza para observar cualquier tipo de muestras teñidas con fluoróforos, que tienen la propiedad de absorber luz a una determinada longitud de onda y emitir a una longitud de onda mayor. En especial, trabajamos con muestras biológicas marcadas con proteínas fluorescentes que absorben luz alrededor de 480 nm y emiten luz alrededor de 520 nm. Para adquirir imágenes de fluorescencia utilizamos entonces el LED que emite luz azul descrito anteriormente, luz que se hace pasar por un filtro pasa-banda, de 470 nm a 490 nm, denominado filtro de excitación, y luego es enviada hacia un espejo dicróico que refleja la luz por debajo de los 500 nm y deja pasar la luz por encima de 505 nm. La luz que se refleja en el espejo dicróico alcanza la muestra a través del objetivo. La luz que se refleja y la luz que emite la muestra es colectada por el mismo objetivo y es enviada hacia el espejo dicróico que selecciona parte de las longitudes de onda. Después del espejo dicróico se coloca un filtro pasa-banda, de 520 nm a 550 nm, para realizar una segunda selección de las longitudes de onda. Finalmente la luz es enfocada en la

CCD con una lente, obteniendo una imagen selectiva de las partes de la muestra que contienen fluoróforo. La denominación *wide-field* tiene que ver con que se ilumina todo el campo visual y se hace imagen completa de la región iluminada de la muestra, a diferencia de otras técnicas en las que la imagen de fluorescencia se construye barriendo un haz sobre la muestra y detectando punto a punto.

4.2.3. Sistema de detección confocal

La detección confocal permite aumentar la resolución axial en un microscopio óptico. La formación de imágenes proviene de una región de la muestra que es la convolución entre el volumen del haz de excitación y el volumen de detección del sistema. En la Fig.4.2 se muestra un esquema de detección confocal, en el que se ve un haz láser enfocado con una lente objetivo en una muestra y que luego desanda el camino hasta llegar a un espejo que deja pasar una parte hacia un detector que tiene una abertura pequeña (*pinhole*) adelante, que bloquea la luz que no provino del plano de iluminación. Con este sistema pueden obtenerse imágenes con muy buena resolución (limitada por difracción) de un plano individual de la muestra si se hace recorrer el haz enfocado sobre ella (con lo cual se pueden construir imágenes tridimensionales). Los microscopios confocales comerciales producen el movimiento relativo entre el haz y la muestra utilizando un sistema de barrido galvanométrico con dos espejos, conocidos como galvos, que hacen pivotear el haz en el plano focal anterior de la lente objetivo. De esta manera se construyen las imágenes de planos de la muestra punto por punto.

En el microscopio desarrollado en este trabajo se utiliza como iluminación la luz que proviene de la fuente de luz láser blanca (seleccionando la longitud de onda con el monocromador). La luz es enfocada con una lente objetivo 50X, luego de pasar por los galvos, GVS002 fabricados por Thorlabs. La luz que vuelve con la información de la muestra desanda el camino, volviendo a pasar por los galvos (*descanning*), para luego enfocarse en una fibra óptica de unos 65 μm de diámetro de núcleo, como fue descrito en 4.1.2 a través de un objetivo 10X que lleva la señal hasta el fotomultiplicador. El elemento que genera la confocalidad del sistema es la misma fibra óptica,

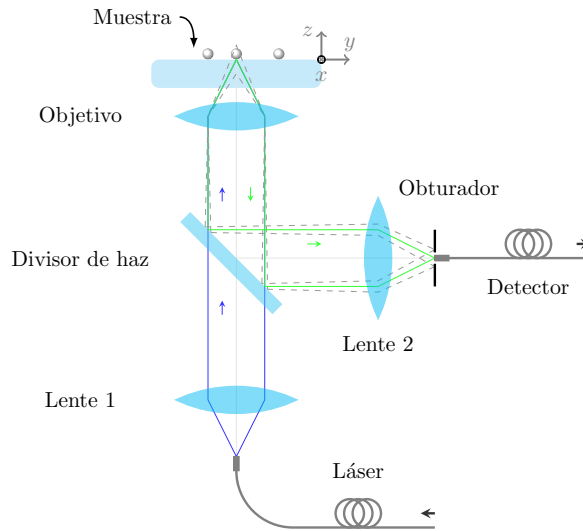


Figura 4.2.: Esquema de la configuración de detección confocal. Sólo la luz que llega del plano focal del objetivo alcanza el detector. En nuestro caso el obturador, o *pinhole*, es el mismo núcleo de la fibra óptica que lleva la luz colectada hasta el fotomultiplicador.

que funciona como *pinhole*. El sistema de galvos con espejos se controla con la placa DAQ por medio de un programa realizado en LabView 8.5 y permite mover el haz en un campo visual de $\sim 200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$. Alternativamente, las imágenes confocales de barrido pueden ser adquiridas utilizando la unidad de traslación descrita en la Sec.3.2, dejando fijo el haz del láser. De esta forma, las imágenes confocales de barrido se obtienen moviendo la muestra respecto del haz, que queda fijo. La *point spread function* configurada fué de 900 nm en el plano de barrido.

4.2.4. Detección espectral interferométrica

Utilizando la configuración confocal y la fuente de luz sintonizable que provee el conjunto PCF-monocromador, se pueden realizar mediciones espectrales interferométricas de la señal de *scattering* proveniente de una muestra [Lindfords et al., 2004]. Consideremos una muestra inmersa en aire que se apoya en un sustrato de vidrio,

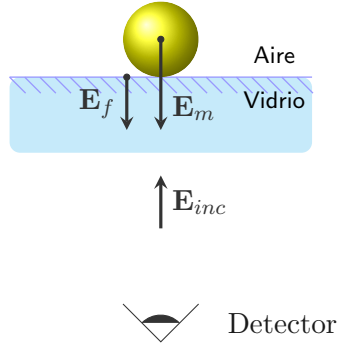


Figura 4.3.: Esquema de la muestra sobre el sustrato y los campos: incidente (E_{inc}), reflejado (E_f) y dispersado por la muestra (E_m). Sólo se considera la reflexión en la cara superior del sustrato ya que la detección es confocal.

Fig.4.3. Supongamos que tenemos un haz incidente E_i desde el lado del sustrato, entonces vamos a tener un haz reflejado E_r en la interfase vidrio-aire y un haz que proviene de la muestra E_s . La señal que mide el fotomultiplicador estará dada por

$$I_m = |E_i|^2|r|^2 + |E_i|^2|s|^2 + |E_i|^2|r||s|\cos(\phi_r - \phi_s), \quad (4.1)$$

donde ϕ_r y ϕ_s son las fases de la señal de reflexión y *scattering*, respectivamente, en el detector, r es el coeficiente de reflexión en la interfaz vidrio-aire y s es el coeficiente de *scattering* de la muestra. El primer término de la Ec.(4.1) es la reflexión de un haz que incide perpendicular a la interfase, desde un medio con índice de refracción n_s y se refleja en un medio con índice de refracción n_m [Saleh and Teich, 2007]. Por lo tanto, el coeficiente r está dado por

$$r = |r|e^{i\phi_r} = \frac{n_s - n_m}{n_s + n_m}e^{-\frac{i\pi}{2}}, \quad (4.2)$$

donde $\phi_r = -\pi/2$ se debe a la acumulación de fase de un haz gaussiano lejos del foco, fenómeno llamado efecto Gouy [Saleh and Teich, 2007]. n_s y n_m corresponden al índice de refracción del vidrio y el aire respectivamente.

El segundo término de la Ec.(4.1) representa la intensidad de *scattering* de la muestra donde s es

$$s = |s|e^{i\phi_s} = \frac{2n_s}{n_s + n_m} \frac{2n_m}{n_s + n_m} \eta |S(\lambda)| e^{i\phi_s}, \quad (4.3)$$

donde se ve que el coeficiente s es igual a la amplitud de *scattering* $S(\lambda)$ de la muestra multiplicada por el coeficiente de transmisión del campo incidente a través de la interfase que va hacia la muestra, por el coeficiente de transmisión del campo de *scattering* de la muestra a través de la interfase aire-vidrio, que llamaremos t , y por un factor η que da cuenta de la eficiencia de colección del sistema. Con la Ec.(4.2) y la Ec.(4.3) podemos reescribir la Ec.(4.1) como

$$I_m = |E_i|^2 (|r|^2 + |t|^2 |\eta|^2 |S|^2 - 2|r||t||\eta||S| \sin(\phi_S)). \quad (4.4)$$

El primer término de la Ec.(4.4) representa la luz de fondo, producto de la reflexión en la interfase vidrio-aire y el segundo término representa la intensidad de *scattering* de la muestra. El tercer término es el interferencial y es proporcional al producto entre el módulo del coeficiente r y el módulo del coeficiente s . La ventaja de tener el término de interferencia radica en que la señal de *scattering* aparece “amplificada” por la señal de fondo, lo que es útil cuando la señal del objeto que se quiere observar es muy pequeña.

A partir de la Ec.(4.4) podemos escribir la función $\sigma(\lambda)$ y haciendo explícitas las dependencias en λ , se tiene

$$\sigma(\lambda) = \frac{I_m - I_f}{I_f} = \frac{t^2 \eta^2}{r^2} |S(\lambda)|^2 - 2 \frac{t\eta}{r} |S(\lambda)| \sin(\phi_S(\lambda)), \quad (4.5)$$

donde $I_f = |E_i|^2 |r|^2$. La relación entre los dos términos del último miembro de la Ec.(4.5) depende de la naturaleza de la muestra. Por ejemplo, si tenemos una muestra de nanopartículas metálicas inmersas en aceite [Lindfords et al., 2004] los dos términos se hacen comparables y $\sigma(\lambda)$ puede tomar valores positivos o negativos dependiendo del tamaño de las nanopartículas y de la longitud de onda incidente. En cambio, si tenemos una muestra con partículas del orden del micrón con índice de refracción real (partículas que no absorben luz), el segundo término en la Ec.(4.5) es despreciable frente al primero.

Resumiendo, a partir de mediciones espectrales confocales podemos calcular la función $\sigma(\lambda)$ que contiene información de las propiedades ópticas de la muestra.

4.3. Espectros de nanopartículas metálicas únicas

En esta sección se presentan fenómenos asociados a la interacción del campo eléctrico con sistemas de nanopartículas metálicas. Se presenta primero una introducción a la plasmónica. Luego se presentan resultados de mediciones espectral interferométricas utilizando el microscopio desarrollado.

4.3.1. Teoría de Mie

Cuando un campo electromagnético incide sobre una nanopartícula metálica produce el desplazamiento colectivo de los electrones de conducción. Cuando el desplazamiento de los electrones es máximo (resonante) hablamos de la excitación de un plasmón. En la aproximación electrostática, válida para el caso en el que las partículas son lo suficientemente pequeñas comparadas con la longitud de onda, el campo eléctrico que incide sobre una esfera de permitividad ϵ , diámetro d e inmersa en un medio de permitividad ϵ_m , hace que se polarice generando un momento dipolar $\mathbf{p} = \epsilon_m \alpha \mathbf{E}_i$, donde la polarizabilidad α es

$$\alpha = \frac{\pi d^3}{2} \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m}. \quad (4.6)$$

A partir de la Ec.(4.6) se puede ver que existe una resonancia plasmónica $\epsilon(\lambda) = -2\epsilon_m(\lambda)$. Los metales presentan valores negativos de la parte real de ϵ en el rango visible y ya que la parte imaginaria es no nula, el denominador nunca se hace cero. Por ejemplo, la resonancia plásmónica de nanopartículas de oro se encuentra alrededor de 520 nm. A medida que el tamaño de las nanopartículas aumenta es necesario formular una teoría que describa mejor el fenómeno, teniendo en cuenta multipolos superiores.

La solución exacta al problema de la interacción de una esfera de tamaño y material arbitrario fue formulada por Mie [Mie, 1908, Bohren and Huffman, 1983], para

un campo eléctrico incidente polarizado en un eje, el campo dispersado por una esfera de diámetro d es [Bohren and Huffman, 1983]

$$E_s^{\perp(\parallel)} = \frac{e^{ik(|\mathbf{r}|-z)}}{-ik|\mathbf{r}|} S_{\perp(\parallel)} E_i^{\perp(\parallel)}, \quad (4.7)$$

donde E_s^{\perp} y E_s^{\parallel} son las componentes del campo dispersado en dirección perpendicular y paralela al plano de dispersión respectivamente, S_{\perp} y S_{\parallel} son funciones las llamadas amplitudes de *scattering*, y \mathbf{r} es la coordenada de observación.

$$S_{\perp} = \sum_n \frac{2n+1}{n(n+1)} (a_n \pi_n + b_n \tau_n), \quad (4.8)$$

$$S_{\parallel} = \sum_n \frac{2n+1}{n(n+1)} (a_n \tau_n + b_n \pi_n). \quad (4.9)$$

Las amplitudes de *scattering* se expresan en las ecuaciones 4.8 y 4.9 en términos de las funciones angulares $\pi_n(\theta)$ y $\tau_n(\theta)$, que se escriben a su vez en términos de las funciones de Legendre de primer tipo. El índice n indica el orden del multipolo excitado por el campo; $n = 1$ corresponde a excitaciones dipolares, $n = 2$ excitaciones cuadrupolares, etc.

También se puede ver que para el caso en el que el campo incidente no está polarizado la intensidad del campo eléctrico dispersado se puede escribir como

$$I_s \propto \frac{1}{2} (|S_{\perp}|^2 + |S_{\parallel}|^2). \quad (4.10)$$

Las funciones S_{\perp} y S_{\parallel} son funciones angulares (del ángulo azimutal respecto del plano de incidencia) que dependen de la longitud de onda del campo eléctrico incidente. Esta dependencia con la longitud de onda se debe a que la información de la permitividad del material de la esfera estudiada está contenida en los coeficientes a_n y b_n que aparecen en las ecuaciones 4.8 y 4.9.

En la Fig.4.4(a) se muestra un gráfico de la eficiencia de *scattering*, $Q_{sca} = C_{sca}/\pi d^2 \propto I_s/\pi d^2$, (la sección eficaz normalizada por el área proyectada por la partícula) en función de la longitud de onda para una nanopartícula de oro de 80 nm de diámetro. En la Fig.4.4(b) se muestra la distribución angular de Q_{sca} , para

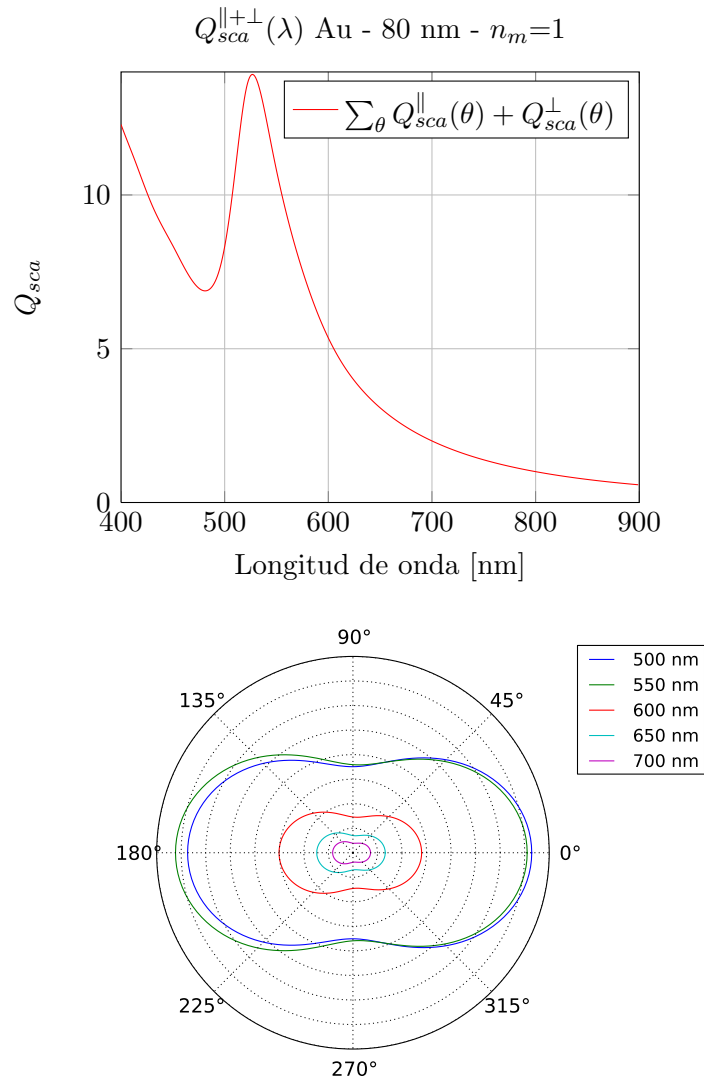


Figura 4.4.: Cálculos de eficiencia de *scattering* utilizando la teoría de Mie para una esfera de Au de 80 nm de diámetro:(a) eficiencia de *scattering* en función de la longitud de onda para ángulos de colección entre -20° y 20° , y (b) distribución angular de la eficiencia de *scattering* a distintas longitudes de onda. 0° representa la detección directa o *forward scattering* y 180° la retro-detección o *backscattering*

distintas longitudes de onda y donde 0° representa la detección directa o *forward scattering* y 180° la retro-detección o *backscattering*.

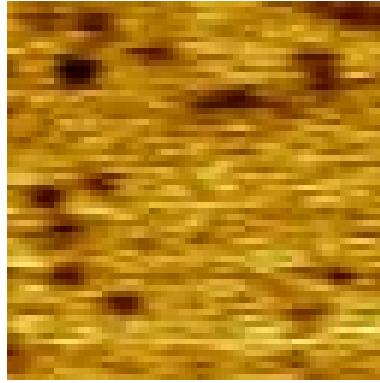
Los cálculos se realizaron con un programa implementado en el lenguaje de programación Python [Python,] basado en el código de [Bohren and Huffman, 1983]. El código python utilizado es una modificación del código publicado en [Scatterlib,].

4.3.2. Medidas del espectro de nanopartículas únicas

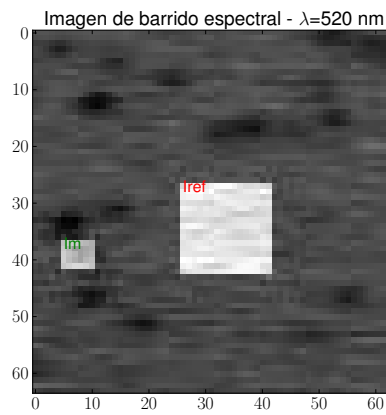
Vamos a describir ahora los resultados que se obtuvieron de mediciones de espectros de nanopartículas individuales, de oro de 80 nm de diámetro (BBInternational Inc.). Las muestras fueron preparadas sobre cubreobjetos redondos de 170 μm de espesor nominal, sonicados, decapados con HCl y finalmente lavados con agua mQ. La preparación final de la muestra se realizó por *spin-coating*¹. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando el microscopio desarrollado en su configuración confocal, la cual permite distinguir cada una de las caras del cubreobjetos pudiendo hacer foco en la interfase cubre-nanopartículas. Como fuente de luz se utilizó la fibra Femtowhite-800 para generar luz láser blanca. Por cada longitud de onda se adquirió una imagen de barrido utilizando la platina PI, la electrónica de control SP100 y el software de adquisición XPMPPro 2.0. Se obtuvieron imágenes de 10 μm x 10 μm típicamente y de 32x32 pixeles. El rango de longitudes de onda medido fue de 480 hasta 750 nm, con un paso de 10 nm. Cabe destacar aquí que por cada pixel que se mide para formar una imagen se realiza una detección *lockin* utilizando tiempos de integración de 30 ms, lo que limita el tiempo de adquisición de las imágenes. Tiempos típicos de adquisición por imagen son del orden de los 40 segundos. Considerando la cantidad de longitudes de onda medidas y el tiempo por imagen, entonces el tiempo de adquisición para medir un espectro completo es de aproximadamente 18 minutos.

En la Fig.4.5(a) se muestra una imagen óptica de barrido de una región de una muestra de nanopartículas de oro de 80 nm de diámetro en aire sobre un cubreobjetos, obtenida para una longitud de onda de 520 nm. En Fig.4.5(b) se muestran las regiones seleccionadas sobre la imagen para el cálculo de I_m e I_f de la Ec.(4.5). La región para I_m se selecciona sobre la partícula de la cual se quiere medir el espectro

¹se utilizó un aparato de *spin-coating* desarrollado en el laboratorio con la colaboración con Facundo Zaldivar [Zaldivar, 2011]



(a)



(b)

Figura 4.5.: Imágenes ópticas de barrido de una muestra de nanopartículas de Au de 80 nm de diámetro en aire depositadas sobre un cubreobjetos. En (a) se muestra la imagen de barrido obtenida a 520 nm de longitud de onda. En (b) se muestra la selección de una porción de la imagen para el cálculo del espectro, I_m , y una región para calcular la intensidad del fondo, I_f .

y la región I_f para extraer el fondo, eligiendo una zona ópticamente plana. Luego, en la región I_m se busca el extremo de la señal y en la región I_f se promedia. Realizando esta tarea para cada imagen, correspondiente a cada longitud de onda, se obtienen los datos para calcular $\sigma(\lambda)$, según la ecuación 4.5.

En la Fig.4.6(a) se muestra el caso de la función $\sigma(\lambda)$ obtenida para la partícula

seleccionada en la Fig.4.5(b). En la Fig.4.6(a) se puede ver también una curva ajustada a los datos experimentales con el cálculo teórico utilizando la teoría de Mie para una partícula de 80 nm de diámetro embebida en aire. Para realizar este ajuste se dejaron libres el parámetro η de la Ec.(4.5) y la longitud de onda central del pico de resonancia plasmónica. Se obtuvo un valor de 0.1 para η , que es un valor muy razonable para las condiciones del experimento, y un corrimiento de 30 nm hacia el rojo respecto del pico del plasmón calculado por Mie.

En la Fig.4.6(b) se muestran los mismos datos experimentales que en la Fig.4.6(a) pero ajustados a la curva experimental de la polarizabilidad $\alpha(\lambda)$ obtenida para una muestra de nanopartículas de oro de 80 nm sobre un sustrato de vidrio [Scarpettini and Bragas, 2010]. Los datos experimentales presentados en el trabajo [Scarpettini et al., 2009] corresponden al coeficiente de extinción, por lo que se invirtieron las siguientes ecuaciones:

$$C_{sca} = \frac{k^4}{6\pi} |\alpha|^2, \quad (4.11)$$

$$C_{abs} = kIm\{\alpha\}, \quad (4.12)$$

para calcular la polarizabilidad α . Puede verse que el ajuste en este caso es mucho más satisfactorio que en el caso de la Fig.4.6(a). Esta mejora en el ajuste puede deberse a dos factores. Por un lado, en la muestra puede haber presentes dímeros de NPs. Las curvas experimentales tomadas de [Scarpettini et al., 2009] son mediciones hechas sobre una muestra extendida que contiene un porcentaje de dímeros.

Los espectros de dímeros de nanopartículas muestran un corrimiento del pico de resonancia hacia el rojo y la aparición de un segundo pico por encima de los 800 nm (lo cual excede el rango de nuestras mediciones). Para un objeto cuyo tamaño sea mucho menor que la *point spread function*, PSF, del microscopio, del orden de las centenas de nanómetros, la imagen óptica tendrá el tamaño de la PSF (como se mencionó antes, se trabajó con una PSF de 900nm) Si en algún lugar de la muestra el haz se encuentra con dos nanopartículas, la imagen óptica va a ser igual a la de una sola nanopartícula a la anterior. Por lo tanto a partir de las imágenes no podemos

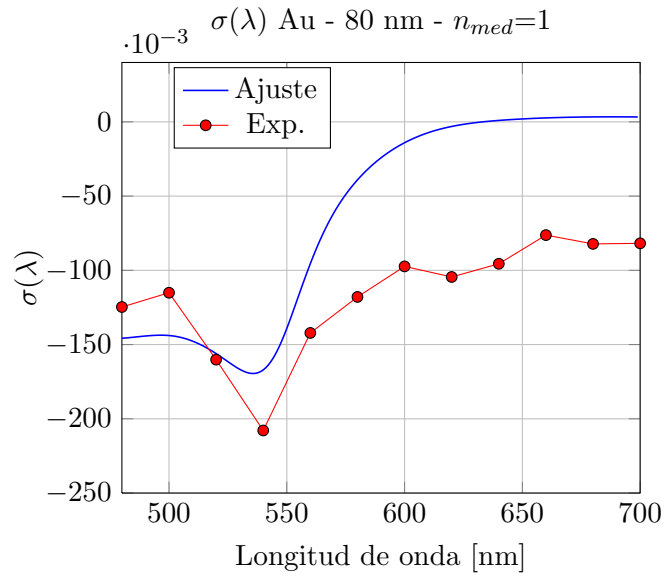
definir si se encontraron dos partículas o una. En cambio, sí se puede decidir a partir de las propiedades ópticas espectrales, como se muestra más adelante.

Por otro lado, se sabe de la bibliografía que cuando una partícula se apoya sobre un sustrato los espectros se corren hacia el rojo [Scarpettini, 2011] [Ruppin, 1983] [Royer et al., 1989] y también puede llegar a aparecer un segundo pico. Esto se debe a la interacción entre el haz incidente, la nanopartícula y el sustrato. El problema es equivalente al de eliminar el sustrato y en su lugar colocar una imagen de la nanopartícula. De esta forma el problema se transforma en la interacción de dos nanopartículas, y esta interacción produce espectros corridos hacia el rojo. La magnitud del corrimiento de la resonancia depende de la distancia que separa la nanopartícula del sustrato. En [Scarpettini, 2011] se muestran curvas teóricas de corrimiento del plasmón en función de la distancia partícula-sustrato de las cuales se obtiene que para separaciones de 5 nm entre una nanopartícula de oro de 80 nm y el sustrato, la resonancia de *scattering* se corre a alrededor de 540 nm (una nanopartícula de oro de 80 nm inmersa en un medio con índice de refracción igual a 1, tiene el plasmón en 520 nm). Esto coincide con los datos medidos en este trabajo.

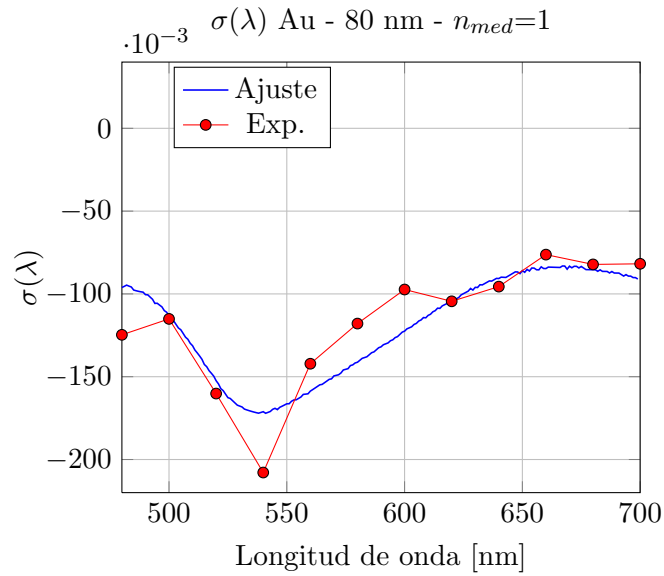
4.4. Espectros de sondas plasmónicas únicas

Las microscopías ópticas de barrido por intensificación de campo, FESOM, como se muestra en [Bragas and Martínez, 1998] [Scarpettini et al., 2009], basan su mecanismo de contraste óptico en la intensificación del campo eléctrico de la luz producido en las vecindades de una estructura plasmónica (sonda) iluminada resonantemente y ubicada en el campo cercano de la muestra que se quiere estudiar. Conocer el comportamiento espectral de la sonda plasmónica en operación es de fundamental importancia para conseguir altas intensificaciones y, por ende, contraste óptico de altísima resolución espacial.

Una de las tareas fundamentales en este tipo de microscopías es fabricar una sonda plasmónica que intensifique suficiente y sea repetible, y que, en lo posible, sea fácil, rápida y barata de fabricar. Típicamente es difícil dar la mejor respuesta a todas las condiciones al mismo tiempo y lo que sucede frecuentemente es que sondas



(a)



(b)

Figura 4.6.: Espectro interferométrico para una nanopartícula de Au de 80 nm de diámetro.

muy buenas son difíciles (y caras) de fabricar. En esta Tesis se propone estudiar las microesferas de sílice decoradas con nanopartículas metálicas (MED), utilizadas

en la [Scarpettini et al., 2009]. La utilización de sondas MED ha demostrado contraste óptico por intensificación de campo con resolución vertical subnanométrica [Scarpettini et al., 2009]. La intensificación que permite obtener las imágenes proviene de la interacción de la MED que quede más cerca del sustrato. En el Capítulo 5 propondremos una forma de fabricación controlada de puntas para microscopía de alta resolución utilizando MEDs y estudiaremos su espectro en operación. En lo que sigue de este capítulo se presentan resultados de mediciones espectrales interferométricas de microesferas (ME) de sílice (SiO_2) de 700 nm, fabricadas por Bangs Laboratories Inc. Estas mediciones se utilizarán como modo de control del método experimental utilizado. Por último se presentan mediciones de MED decoradas con nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro, depositadas sobre cubreobjetos de vidrio.

4.4.1. Espectros de microesferas de sílice (ME)

Utilizando el método de detección espectral interferométrica de barrido descrito en la secciones 4.2.4 y 4.3 se presentan aquí resultados de las mediciones sobre ME de sílice (SiO_2) de 700 nm de diámetro nominal. Las muestras se prepararon sobre cubreobjetos sonicados, decapados y lavados, colocando una gota diluida de solución de las ME y realizando un proceso de spin-coating. En la Fig.4.7 se muestra una imagen óptica de barrido de tres microesferas de sílice de 700 nm de diámetro, para 520 nm de longitud de onda incidente.

La eficiencia de *scattering* calculada utilizando la teoría de Mie para las microesferas en cuestión se muestra en la Fig.4.8. Se muestra en Fig.4.8 la eficiencia de scattering en función del ángulo, en donde la partícula se encuentra en el origen de coordenadas y la luz incidente llega desde el ángulo 180° . Como se puede ver, la mayor cantidad de luz dispersada por las ME de sílice se produce en la dirección opuesta a la que se mide. Aunque la señal es suficiente para ser detectada, como se muestra en la Fig.4.9, donde se muestra el espectro para la microesfera seleccionada en la Fig.4.7. Respecto del espectro para las MEs, podemos decir que el índice de refracción de la sílice es real, no hay absorción, y por lo tanto el término de interfe-

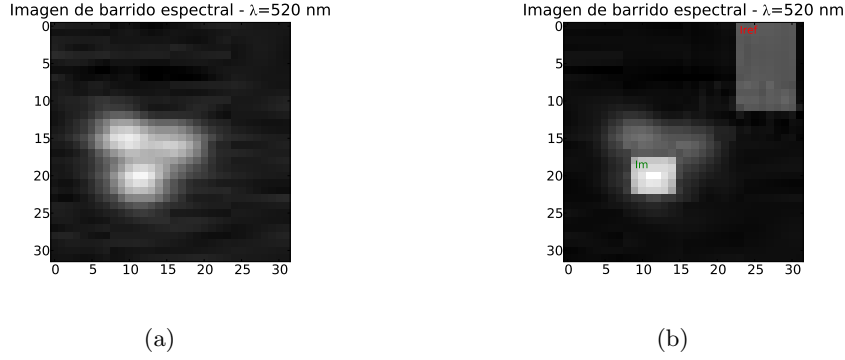


Figura 4.7.: (a) Imagen óptica de barrido de microesferas de sílice de 700 nm de diámetro para $\lambda=520$ nm. (b) Selección de una de las partículas y del fondo para el cálculo de la función $\sigma(\lambda)$.

rencia de la Ec.(4.5) se hace igual a cero. Podemos escribir entonces la función $\sigma(\lambda)$ para las microesferas como

$$\sigma(\lambda) = \frac{t^2 \eta^2}{r^2} |S(\lambda)|^2. \quad (4.13)$$

Es decir que cuando medimos la función $\sigma(\lambda)$ estamos midiendo esencialmente la intensidad de *scattering*. Sin embargo, puede verse en la Fig.4.9 que para ciertas longitudes de onda la curva toma valores negativos. Esto se puede explicar si tenemos en cuenta que el índice de refracción de la sílice es muy cercano al índice de refracción del sustrato que sostiene las partículas, y si consideramos que en los lugares de apoyo de las microesferas el coeficiente de reflexión r disminuye respecto de los puntos donde no hay microesferas. De esta manera, la resta de los valores experimentales realizada en la Ec.(4.5), puede tomar valores negativos cuando S es pequeña. Comparando la Fig.4.8 y la Fig.4.9 se observa una buena correlación entre el cálculo y las mediciones, con mínimas desviaciones en la altura relativa de los picos. Estos resultados son compatibles con mediciones similares hechas por microscopia de campo oscuro ya reportadas en la literatura [Xiao et al., 2010] en donde se presentan resultados de mediciones espectrales de microesferas de sílice huecas recubiertas por nanocristales de oro utilizando microscopía de campo oscuro. En ellas se observa el mismo comportamiento que observamos, en el que los picos de

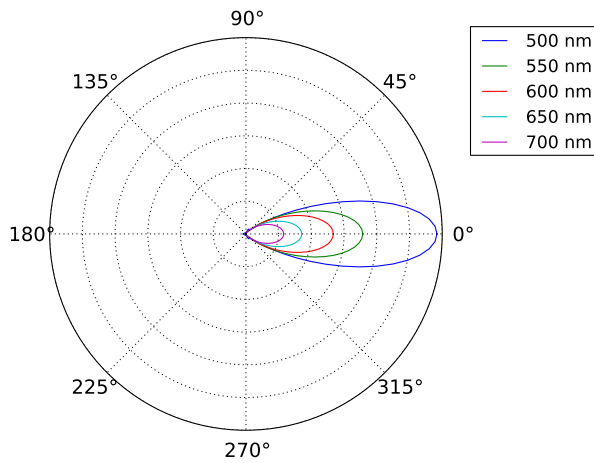
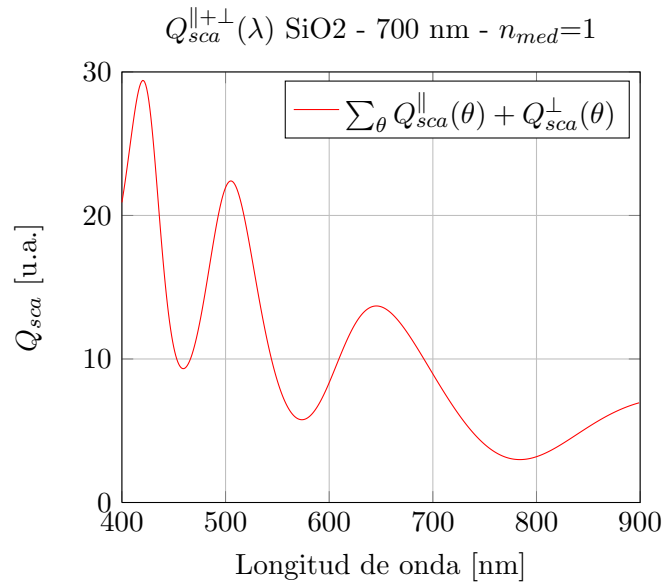


Figura 4.8.: Cálculos de *scattering* utilizando la teoría de Mie para una esfera de SiO₂ de 700 nm de diámetro:(a) eficiencia de *scattering* en función de la longitud de onda para un ángulo de colección de 40°(ángulo de colección del objetivo 20X NA 0.4 utilizado) y (b) distribución angular de la eficiencia de *scattering*.

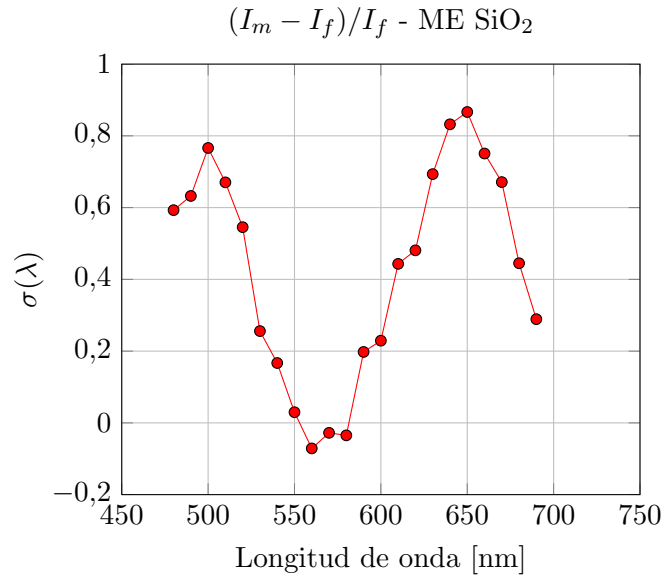


Figura 4.9.: Espectro medido para una microesfera de sílice de 700 nm de diámetro sobre un sustrato de vidrio.

resonancia de la microesfera sin recubrimiento se corren hacia el rojo y además se intensifican cuando se las recubre con los nanocristales. Hay mucha disparidad en los resultados presentados en la literatura acerca de si se ven o no las oscilaciones que predice la teoría de Mie para las esferas de SiO₂. Es claro que estas oscilaciones aparecen si se trata de una partícula individual y es menos probable de verlas en los casos de muestras extendidas en donde la dispersión de tamaños y la concentración desdibuja las oscilaciones.

4.4.2. Espectros de microesferas decoradas

En esta subsección se presentan mediciones espectrales de microesferas de sílice de 700 nm de diámetro decoradas con nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro y como se describe en el trabajo de [Scarpettini et al., 2009, Zaldivar, 2011]. Como se ha mencionado, las microesferas decoradas han tenido éxito como sondas plasmónicas para microscopía óptica de alta resolución [Scarpettini et al., 2009]. Cabe notar que las puntas utilizadas en [Scarpettini et al., 2009] han sido fabricadas utilizando

un método de inmersión con el cual recubren alambres metálicos (puntas para STM) con las microesferas decoradas y que por lo tanto hubo escaso control acerca de cuál es la estructura plasmónica que interactúa con la muestra. Es importante conocer las propiedades ópticas que tiene la MED que interactúa con la muestra ya que para lograr una buena intensificación y resolución es necesario excitar una resonancia de la estructura plasmónica. Es decir que si en una MED las nanopartículas que la recubre forman una estructura (dímeros, trímeros o estructuras más complejas) con resonancia plasmónica en 700 nm, conviene excitar la dupla punta-muestra a esa longitud de onda para obtener un resultado óptimo en las imágenes. Otro aspecto importante a la hora de fabricar las puntas es que las MED no son todas iguales, algunas están muy recubiertas y otras tienen pocas nanopartículas en sus superficie o tiene zonas en las que no hay nanopartículas. En la Fig.4.10 se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las microesferas de sílice de 700 nm de diámetro decoradas con nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro en las que se puede observar que algunas MED están uniformemente decoradas, otras tienen estructuras de nanopartículas que sobrepasan la primera capa de recubrimiento y otras que tienen regiones sin nanopartículas. Si por ejemplo, al fabricar por inmersión las puntas, hay una MED que queda sobre las demás (y por lo tanto es la que va a interactuar con la muestra), pero es una MED que no está bien decorada, entonces esa punta no podrá utilizarse o en todo caso no producirá una intensificación adecuada. Por esta razón, es imprescindible desarrollar un método de fabricación de puntas para microscopía óptica de alta resolución que permita fabricar puntas de manera controlada. En este trabajo se propone y se presentan resultados de la fabricación de sondas plasmónicas utilizando como soporte de las MED un sensor de AFM. La idea es caracterizar espectralmente las MED (depositadas en un sustrato) de manera individual y luego elegir una sola de ellas y pegarla en la punta del sensor de fuerza. En el capítulo que sigue se abordará en más detalle la fabricación de las puntas. En lo que sigue se presentan resultados de las mediciones espectroscópicas de MED individuales sobre un sustrato de vidrio.

Las MED utilizadas en este trabajo fueron fabricadas por Facundo Zaldivar según

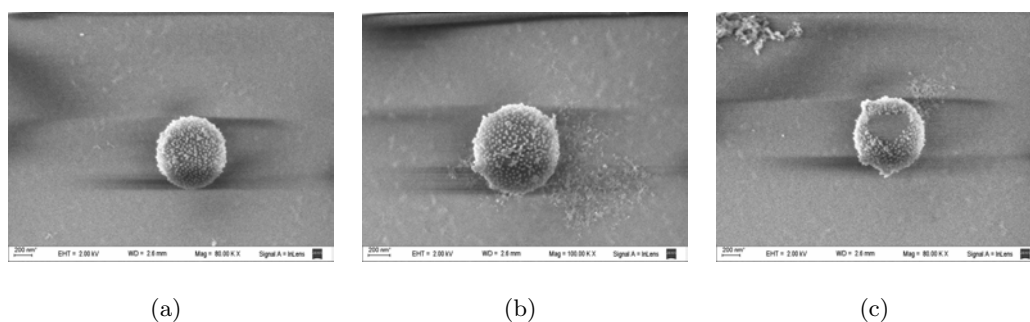


Figura 4.10.: Imágenes SEM de microesferas decoradas con nanopartículas de Au de 20 nm de diámetro MEDs. Los recubrimientos de las microesferas pueden ser (a) de una capa, (b) con estructuras por encima de una capa y (c) parciales.

el protocolo descrito en [Zaldivar, 2011]. Las muestras que se utilizaron para realizar las mediciones fueron preparadas sobre cubreobjetos sonicados, decapados y lavados con agua mQ. Por *spin-coating* se esparció una gota de la solución de MED sobre el cubreobjetos y luego se dejó secar. El método utilizado para realizar las mediciones espectrales para caracterizar las MED es el mismo que se utilizó para medir las nanopartículas y las microesferas de las secciones anteriores.

En la Fig.4.11 se presenta un espectro de extinción de microesferas de 700 nm de diámetro decoradas con nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro en solución acuosa utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Se puede observar un pico de resonancia en ~ 540 nm, y una pequeña estructura entre 640 nm y 730 nm. El pico de resonancia en 540 nm no coincide con el plasmón de una esfera de oro de 20 nm en agua, sino con el pico correspondiente a un dímero de nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro, sumergidas en agua, con una separación de 13 nm entre sus superficies [Nordlander et al., 2004, Zaldivar, 2011]. Estructuras como los dímeros pueden estar presentes, entre otras, en los recubrimientos de las microesferas (ver Fig.4.10). Lo que está mostrando el espectro de la Fig.4.11 es la estructura de dímeros dominante del recubrimiento de nanopartículas y una separación media, promediada sobre toda la muestra, de aproximadamente 13 nm. Cabe notar también que en esta medición en volumen y con una alta concentración de MEDs, las oscilaciones del

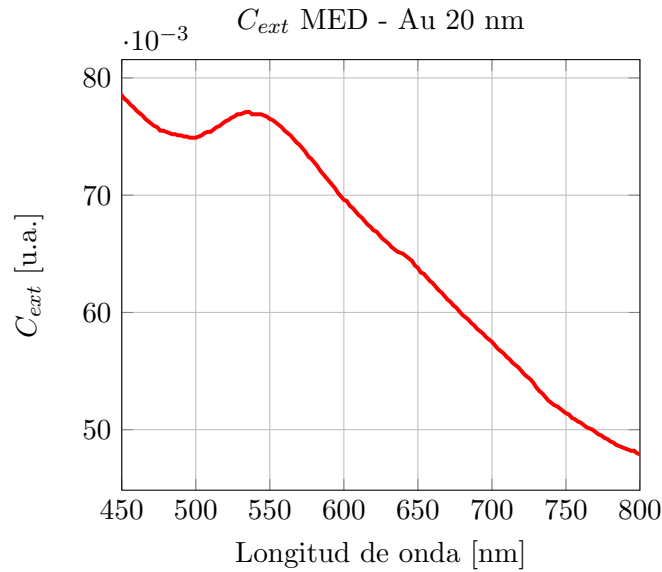


Figura 4.11.: Espectro de microesferas de sílice de 700 nm de diámetro decoradas con nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro, suspendidas en una solución acuosa, medido con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800.

espectro de las microesferas (Fig.4.8) no se observan ya que estarían promediadas en toda la muestra.

Las mediciones espectrales de una sola microesfera de sílice de 700 nm de diámetro decorada con nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro se presentan en la Fig.4.12. Se puede observar, comparando con el espectro de ME desnuda de la Fig.4.9, que la estructura plasmónica debida a la decoración con NPs intensifica la parte roja del espectro. El pico que se encontraba en 510 nm pasó a estar en 520 nm mientras que el que el pico que se encontraba en 650 nm se reemplazó por una respuesta espectral no trivial con su máximo en 700 nm. Los corrimientos de los picos y los cambios de intensidad relativa y forma se deben a la presencia de las nanopartículas del recubrimiento. Esto coincide con los resultados presentados en un trabajo reciente por [Xiao et al., 2010] donde se muestran mediciones de campo oscuro de espectros de microesferas de poliestireno huecas recubiertas con nanocristales de oro, y en los que se observa el mismo comportamiento que observamos en este trabajo: el recu-

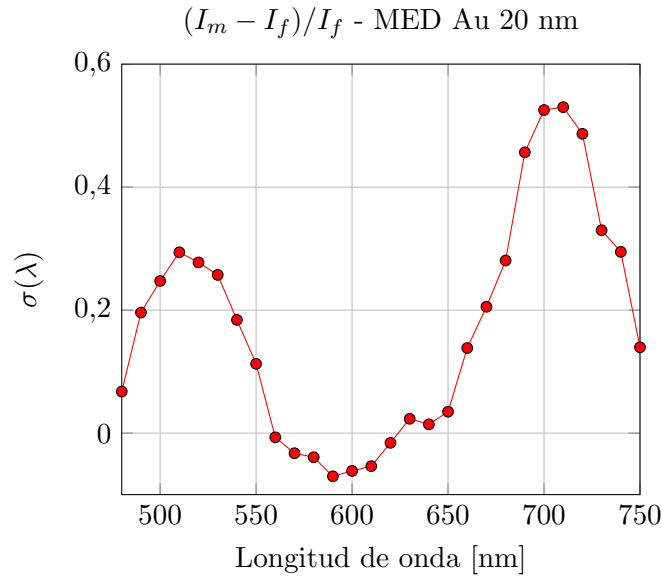


Figura 4.12.: Mediciones del espectro de una microesfera sílice de 700 nm de diámetro decorada con nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro.

brimiento de nanopartículas produce una intensificación de la región roja-infraroja del espectro de las microesferas sin recubrimiento.

4.5. Conclusiones

En este capítulo se presentaron mediciones ópticas espectrales utilizando como plataforma el microscopio desarrollado. Utilizando un sistema óptico de detección confocal, una plataforma de barrido y una fuente de luz blanca se logró medir el espectro de estructuras plasmónicas únicas, a saber, de nanopartículas de oro de 80 nm de diámetro y de microesferas de sílice de 700 nm de diámetro sin recubrimiento y con recubrimiento de nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro.

Los espectros obtenidos para las nanopartículas únicas de oro pueden ser compatibles con dos interpretaciones. La primera es que no se puede discriminar si lo que se está midiendo es un dímero de nanopartículas o una nanopartícula única interactuando con el sustrato, y la segunda es que lo que se mide el espectro de

una nanopartícula interactuando con el sustrato. Dado que la mayoría de las nanopartículas mostraron un espectro similar y que la formación de dímeros no es dominante, la explicación que más se ajusta es la segunda la cual es relevante a la hora de usar las estructuras plasmónicas como sondas de microscopía óptica de campo cercano.

Los espectros de las microesferas sin recubrimiento mostraron un espectro con dos picos en el rango de longitudes de onda que va desde 480 nm hasta 750 nm, uno centrado en 510 nm y otro centrado en 650 nm. El mismo espectro se registró para todas las microesferas estudiadas. Los espectros presentados son compatibles con los cálculos de *scattering* utilizando la teoría de Mie, que también muestran dos picos en las mismas posiciones.

Para las microesferas decoradas con nanopartículas de oro se midieron espectros que también presentaban una estructura con dos picos en el rango de longitudes de onda utilizadas, pero con las posiciones corridas respecto de los picos para las esferas sin recubrimiento. Posiciones típicas de los picos son 520 nm y 700 nm. Además se observó un cambio en la altura relativa de los picos respecto de las microesferas sin recubrimiento. Las estructuras formadas por las nanopartículas del recubrimiento son las responsables del corrimiento de los picos y de la intensificación del pico más rojo.

Capítulo 5.

Microscopio Combinado AFM-Óptico.

Aplicaciones a la plasmónica.

En este capítulo presentamos resultados obtenidos utilizando una plataforma experimental que combina los microscopios AFM y óptico desarrollados en este trabajo y presentados en los capítulos anteriores.

El estudio de algunos sistemas físicos y biológicos requieren la visualización de fenómenos de escalas espaciales y/o de naturaleza distintas. Como se discutió en la Introducción, la combinación de dos herramientas poderosas, como lo son la microscopía óptica y la de fuerza, abren la puerta al estudio de variados sistemas. En esta Tesis presentamos resultados obtenidos del estudio de dos sistemas particulares. El primero que presentamos es la fabricación de puntas para microscopía óptica de alta resolución, que está basada en la utilización de las microesferas decoradas con nanopartículas (descritas en el capítulo anterior) como estructuras plasmónicas resonantes y en la utilización de sensores de fuerza de microscopía AFM como soporte de las sondas. El segundo sistema sobre el que realizamos mediciones es un sistema biológico, que se discutirá en el Capítulo 6.

En la Fig.5.1 se muestra un esquema del microscopio combinado a partir de las partes óptica y AFM descritas anteriormente. El cabezal AFM se encuentra sobre la muestra de manera tal que el sensor de fuerza queda enfrente a la lente objetivo. Con esta configuración conseguimos acoplar dos microscopías con resoluciones espaciales distintas (la escala micrométrica del microscopio óptico y la escala na-

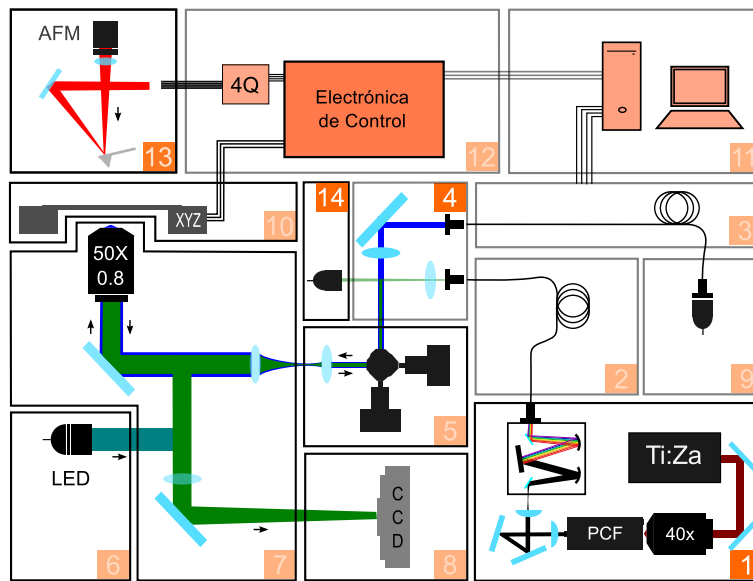


Figura 5.1.: Esquema del arreglo experimental óptico-AFM:1) fuentes de luz láser, Ti:Za y PCF, 2) y 3) fibras ópticas de entrada/salida, 4) puertos de entrada, 5) galvos, 6) puerto de iluminación LED, 7) objetivo, 8) cámara CCD, 9) PMT, 10) unidad de traslación PI, 11) computadora, 12) electrónica de control RHK y PI, 13) cabezal AFM, 14) fotodiodo de monitoreo.

nométrica del AFM). Además combina las capacidades de medir simultáneamente diferentes propiedades de cada una de las partes. El microscopio AFM permite realizar micro y nano-manipulaciones (el sensor de fuerza puede interactuar con partes de una muestra y modificarlas) y también permiten medir características e interacciones mecánicas en una muestra. El microscopio óptico permite visualizar la muestra y también el sensor de fuerza del AFM cuando está cerca de ella. De esta manera logramos tener una herramienta muy poderosa, podemos por ejemplo visualizar la muestra, que puede estar modificada con marcadores ópticos, y dirigir de manera controlada el sensor de fuerza hacia cualquier lugar de ella. Pongamos un ejemplo biológico: si tenemos una célula que fué transfectada de manera tal que una proteína particular de la membrana es expresada junto a una proteína fluorescente, entonces

con el microscopio óptico en la configuración de fluorescencia *wide-field* podemos identificar las regiones de la célula en las que se encuentra la proteína que queremos estudiar y luego acercar el sensor de fuerza hacia ella y realizar las mediciones (la punta del sensor podría tener proteínas adheridas para estudiar su interacción específica con las proteínas marcadas de la célula), y al mismo tiempo releva la respuesta óptica de la célula debida a la interacción en la punta.

En este capítulo presentamos sondas plasmónicas para microscopía óptica de alta resolución caracterizadas y ensambladas *in-situ* utilizando el microscopio combinado AFM-Óptico que hemos desarrollado.

Como mencionamos en el capítulo anterior, en [Scarpettini et al., 2009] se presentan imágenes ópticas de alta resolución utilizando sondas plasmónicas construidas utilizando microesferas decoradas con nanopartículas, pegadas sobre puntas de microscopía túnel. Como también mencionamos acerca de ese trabajo, la fabricación de las sondas se realiza por inmersión en una dilución de microesferas decoradas que van a recubrir la punta. La intensificación de la luz que ilumina el par punta-muestra la produce la microesfera más cercana a la muestra. En la Fig.5.2 se muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido en de la punta utilizada en [Scarpettini et al., 2009] en la que se puede ver la punta de alambre de platino y las microesferas decoradas adheridas en su superficie. Como se ve, no es posible tener control acerca de como se pegan las MED (en que lugares) ni tampoco sobre cual de las microesferas va a interactuar con la muestra.

Dado que las puntas utilizadas en [Scarpettini et al., 2009] permitieron obtener imágenes de ópticas de alta resolución, es interesante y prometedor continuar con el diseño y la fabricación de las sondas basadas en MED. En lo que sigue vamos a ver como, a partir de una muestra de MED sobre un cubreobjetos, se caracterizaron y fabricaron sondas plasmónicas formadas por una sola MED pegada en la punta de un sensor de fuerza de AFM.

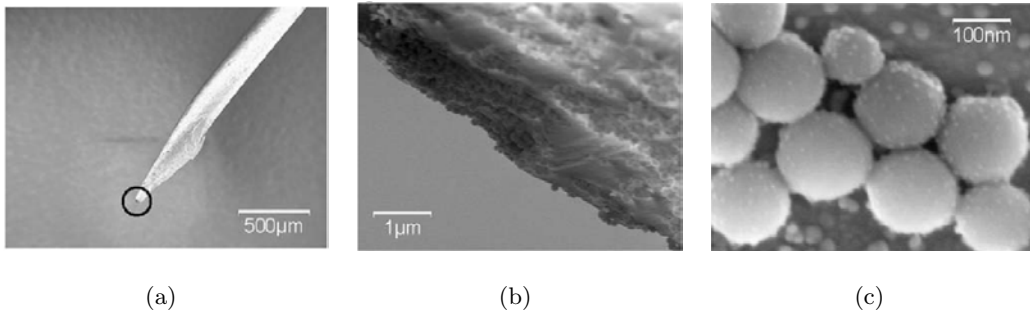


Figura 5.2.: Imágenes de una sonda plasmónica utilizada por [Scarpettini et al., 2009] para obtener imágenes ópticas de alta resolución. Las sondas están formadas por una punta de platino (típicamente utilizada para STM) y microesferas decoradas con nanopartículas adheridas.

5.1. Fabricación de las sondas plasmónicas *in-situ*

La caracterización principal de una sonda plasmónica consiste en conocer la o las longitudes de onda a la cuales se produce la excitación resonante y por consiguiente una eficiente intensificación del campo electromagnético. Por lo tanto, conocer las propiedades ópticas de la sonda es esencial en este tipo de microscopía. Hay dos abordajes posibles al problema de la fabricación y utilización de las puntas plasmónicas, uno es fabricar siempre la misma estructura, la cual bastará caracterizar una sola vez, y elegir la longitud de onda a la cual resuena la estructura. El otro abordaje posible es fabricar las puntas y caracterizarlas *in-situ*, para poder conocer la longitud de onda con la que hay que iluminar la sonda. Es posible fabricar puntas con alta reproducibilidad [Sanchez et al., 2002, Bouhelier, 2006] con procesos de fabricación costosos y que requieren mucha inversión de tiempo. Por otro lado, procesos de fabricación de puntas como el utilizado en [Scarpettini et al., 2009] es un método de bajo costo y rápido, pero no permite realizar puntas de manera repetitiva ya que no se puede controlar que todas las puntas que se fabriquen tengan la misma estructura y, por lo tanto, la longitud de onda de la resonancia plasmónica. Las sondas utilizadas en este trabajo son sondas que se fabrican y caracterizan en un mismo

aparato, el microscopio combinado, con lo cual conocemos las propiedades ópticas de cada sonda que se fabrica.

Las sondas que fabricamos están compuestas por una MED adherida covalentemente a la punta de un sensor de AFM, que ha sido previamente funcionalizada con un aminosilano, el APS. El APS en un extremo se une covalentemente al Si del sensor de fuerza y en el otro al metal de las NPs [Scarpettini, 2011]. En la Fig.5.3 se esquematiza el proceso de fabricación, se comienza preparando una gota de solución de MED en un cubreobjetos *spin-coating*. El siguiente paso es colocar la muestra en el microscopio y elegir un lugar limpio (sin MEDs) del cubreobjetos en donde acercar la punta del sensor de fuerza utilizando el módulo AFM del microscopio. Luego hacemos que el haz láser con el que vamos a iluminar la muestra se coloque en la posición en la que se observa la punta, utilizando la cámara CCD para visualizar el *spot* y la punta en contacto con el cubreobjetos, y utilizando los galvos para mover el *spot* y colocarlo sobre la punta. Una vez alineados el haz y la punta, levantamos el sensor y elegimos una región de trabajo moviendo la platina PI y utilizando el modo de operación de campo brillante con transiluminación. Luego seguimos con la etapa de selección de las MED, que se realiza midiendo su espectro. Como último paso en la fabricación de las sondas nos queda pegar las MED a la punta del sensor de AFM recubierto con APS. Como el spot y la punta fueron previamente alineados, para pegar la MED lo que hacemos es bajar la punta hasta que haga contacto con la muestra (con la cámara CCD). Finalmente retraemos la punta y la alejamos de la muestra. Cumplido el protocolo la punta queda lista. La confirmación de que se logró pegar la MED a la punta la da la visualización de la muestra a través de la CCD, antes de bajar la punta se ve la MED y luego de bajar y retraer la punta la MED no se ve más. Lo que no se puede resolver con el microscopio desarrollado es en que lugar exacto de la punta quedó pegada la MED. Como ejemplo de esto último podemos ver la Fig.5.4 en la que se muestran distintas sondas fabricadas como se describió, en la que las MEDs adheridas en distintas posiciones del sensor de AFM.

El porcentaje de fabricación de sondas dentro del total de intentos de fabricación fue aproximadamente del 50 por ciento. La adhesión de las microesferas depende de

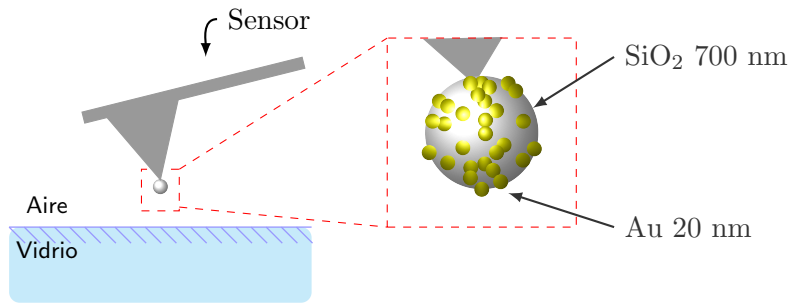


Figura 5.3.: Esquema de una sonda para FESOM utilizando un sensor de microscopía AFM y microesferas de sílice decoradas con nanopartículas de oro.

que la punta esté bien recubierta de APS y del grado de decoración de las microesferas. Si las puntas perdieron el APS entonces las MED no se van a adherir. El caso inverso sucede cuando las microesferas ofrecen regiones desnudas a la punta del sensor de fuerza, como se ve en la Fig.4.10(c). Por otro lado, se vio que todas las MED que se lograron pegar a las puntas tienen un buen recubrimiento de nanopartículas, como se aprecia en la columna de la derecha de la Fig.5.4.

5.2. Medición de espectros en función de la altura

El estudio que complementa los resultados mostrados hasta ahora es el del espectro de las microesferas en función de la distancia a la muestra. En esta sección se presentan mediciones espectrales en función de la distancia punta-muestra.

Las mediciones de los espectros en función de la altura sonda-muestra se midieron a continuación de la fabricación de las sondas (sin modificar nada en el arreglo experimental ni en la muestra). En esta sección, los espectros que se presentan corresponden a la sonda que se muestra en la foto de la Fig.5.4(e). En la Fig.5.5 se muestra esquemáticamente las distintas alturas de la sonda sobre el sustrato en las que se midió el espectro. La señal que vamos a medir (con la sonda y el láser alineados) es la interferencia, I_m , de tres campos: el campo que se refleja en la interfase sustrato-aire, el campo que es dispersado por la punta del sensor AFM,

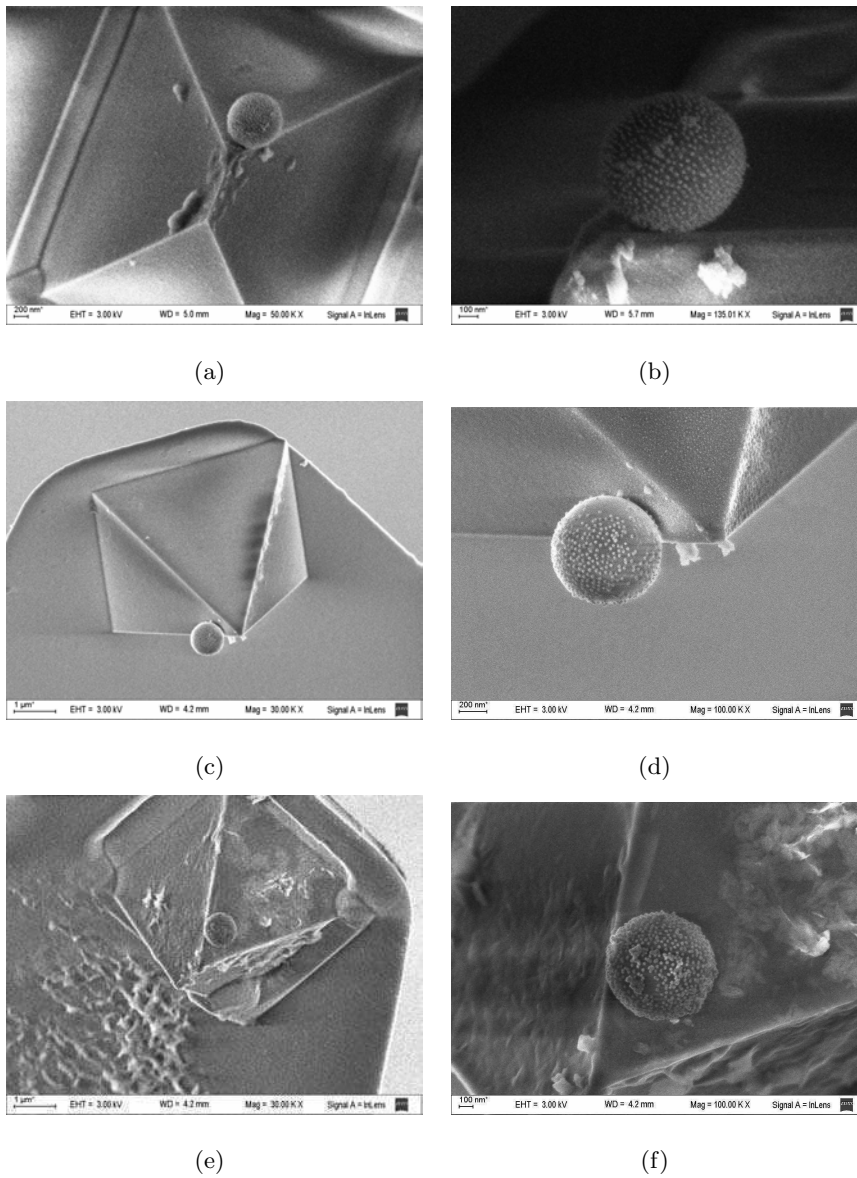


Figura 5.4.: En la columna de la izquierda se muestran imágenes SEM de distintas sondas fabricadas con el microscopio combinado, en donde puede verse que las MEDs quedan efectivamente adheridas al sensor de AFM. En la columna de la derecha se muestran en detalle las MEDs adheridas en cada punta (una punta por fila de imágenes).

y el campo que dispersa la sonda plasmónica que está adherida a la punta. Esta interferencia esta dada por:

$$I_m = |\mathbf{E}_m + \mathbf{E}_p + \mathbf{E}_f|^2, \quad (5.1)$$

donde E_m es el campo eléctrico dispersado por la sonda, E_p es el campo eléctrico dispersado por la punta del sensor de AFM y E_f es el campo eléctrico reflejado en la interfase vidrio-aire. Los campos recién mencionados se pueden escribir como

$$E_m = E_i |s_m| e^{i(\phi_m - k2d_m)}, \quad (5.2)$$

$$E_p = E_i |s_p| e^{i(\phi_p - k2d_p)}, \quad (5.3)$$

$$E_f = E_i |r| e^{i-\frac{\pi}{2}}, \quad (5.4)$$

Dado que la sonda y la punta se encuentran a una distancia d_m y d_p , respectivamente, sobre el sustrato, en los campo de la Ec.(5.2) y de la Ec.(5.3) hay un término de fase $k2d$, donde $k = 2\pi/\lambda$. El coeficiente s_m es igual al coeficiente s de la Ec.(4.3) y contiene la información de los coeficiente de transmisión a través de la interfase vidrio-aire, y de las propiedades ópticas de la MED. De la misma manera, el coeficiente s_p de la Ec.(5.3) representa las propiedades ópticas de la punta del sensor de AFM. El coeficiente de reflexión en la interfase r de la Ec.(5.4), es el mismo de la Ec.(4.2). Con los campos definidos de esta manera se puede ver que la Ec.(5.1) queda

$$\begin{aligned} I_m = & |r|^2 |E_i|^2 + |s_p|^2 |E_i|^2 + |s_m|^2 |E_i|^2 \\ & - 2|s_p|^2 |E_i|^2 |r| \sin(\phi_p - kd_p) \\ & - 2|s_m|^2 |E_i|^2 |r| \sin(\phi_m - k2d_m) \\ & + 2|s_m| |s_p| |E_i|^2 \sin(\phi_m - \phi_p + k2(d_m - d_p)). \end{aligned} \quad (5.5)$$

Supongamos que tenemos solamente la punta del sensor de AFM separada una distancia d_p del sustrato, entonces la intensidad medida, I_p , va a estar dada por la expresión siguiente

$$I_p = |r|^2|E_i|^2 + |s_p|^2|E_i|^2 - 2|s_p|^2|E_i|^2|r|\sin(\phi_p - k2d_p). \quad (5.6)$$

La intensidad de luz reflejada en la interfase vidrio-aire está dada por:

$$I_f = |r|^2|E_i|^2. \quad (5.7)$$

Utilizando las tres ecuaciones anteriores podemos definir entonces una función $\sigma(\lambda)$ de forma similar a lo hecho en la Ec.(4.5), como

$$\sigma(\lambda) = \frac{I_m - I_p}{I_f}. \quad (5.8)$$

De esta forma estamos restando los términos de interferencia entre el campo reflejado en la punta y el campo reflejado en el sustrato, de la interferencia total de los tres campos (los dos mencionados y el dispersado por la MED). La resta anterior la normalizamos con el campo reflejado I_f . Entonces, utilizando la misma notación de la Ec.(4.5), tenemos que

$$\begin{aligned} \sigma(\lambda) = \frac{t^2\eta^2}{r^2}|S_m(\lambda)|^2 & - 2\frac{t\eta}{r}|S_m(\lambda)|\sin(\phi_m(\lambda) - k2d_m) \\ & + 2\frac{|S_m||S_p|\eta^2t^2}{r^2}\cos(\phi_m - \phi_p). \end{aligned} \quad (5.9)$$

Los primeros dos términos del lado derecho de la igualdad en la Ec.(5.9) son los términos de interferencia que provienen únicamente de la sonda plasmónica adherida a la punta de AFM. El tercer término de la Ec.(5.9), es la interferencia de los campos dispersados por la sonda, E_m , y la punta, E_p . La contribución de cada término de la Ec.(5.9) va a depender de la distancia sonda-sustrato.

En la Fig.5.6 se muestran los pasos a seguir para lograr una caracterización óptica completa a cada altura elegida: 1) medir la intensidad de luz con el haz y la sonda alineados, I_m , Fig.5.6(a), 2) medir la intensidad de luz colocando el *spot* (utilizando los galvos) a un costado de la sonda, para medir la luz dispersada por la punta del sensor AFM, I_p , Fig.5.6(b), y 3) medir la intensidad de luz reflejada en la interfase

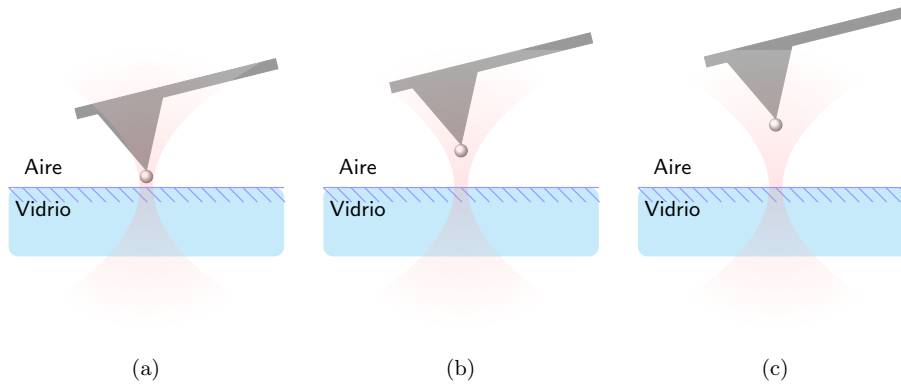


Figura 5.5.: Esquema de la medición del espectro en función de la altura de las sondas plasmónicas fabricadas.

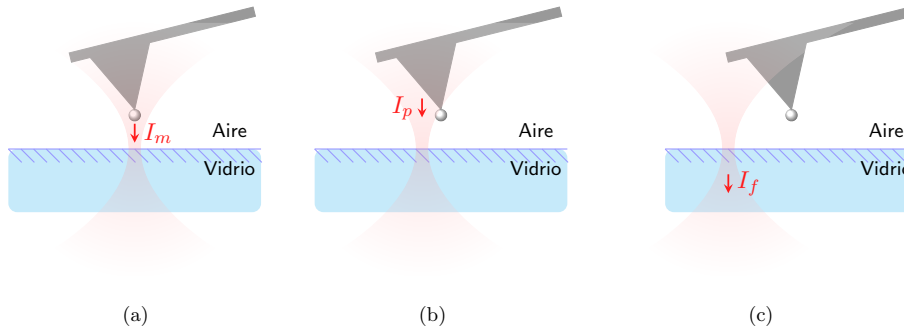


Figura 5.6.: Se muestran los pasos a seguir para lograr una caracterización óptica completa a cada altura elegida: 1) medir la intensidad de luz con el haz y la sonda alineados, I_m , 2) medir la intensidad de luz colocando el *spot* a un costado de la sonda, para medir la luz dispersada por la punta del sensor AFM, I_p y 3) medir la intensidad de luz reflejada en la interfase sustrato-aire, colocando el *spot* del láser lejos de la sonda y de la punta.

sustrato-aire, colocando el *spot* del láser lejos de la sonda y de la punta (también utilizando los galvos). De esta forma, las mediciones de $\sigma(\lambda)$ para la sonda plasmónica a distintas alturas la calculamos utilizando la Ec.(5.8).

Los espectros en un punto fijo los medimos utilizando el microscopio en la configuración confocal (4.1.1) llevando la señal de salida del PMT al amplificador *lock-in*,

obturando el láser de entrada con un *chopper*, y luego a la computadora (no utilizamos el módulo RHK como en el modo de barrido).

Las figuras 5.7(a), 5.7(b) y 5.7(c) se muestran los espectros de la sonda plasmónica adherida a la punta del sensor de AFM a tres distancias sonda-muestra d distintas (de menor a mayor distancia). En este caso la muestra es el sustrato de vidrio del que fue desprendida la sonda plasmónica. Pueden apreciarse en las tres figuras unas oscilaciones, cuyo período aumenta a medida que se disminuye la distancia sonda-muestra. Esta oscilación proviene del desfase introducido por el *scattering* de la punta de AFM (que llamamos fondo) que se pone de manifiesto cuando interfiere con la reflexión en el sustrato (recordar que tenemos una detección interferométrica). El desfase va como $4\pi d/\lambda$ de manera que del período de las oscilaciones puede inferirse d . A medida que la distancia d se acorta, el *scattering* de la estructura plasmónica le gana al fondo y por lo tanto el término dominante en la Ec.(5.9) es el primero. En la Fig.5.7(a) sólo se observa la interferencia, en la Fig.5.7(b) comienza a notarse la presencia del *scattering* de la estructura plasmónica, mientras que en la Fig.5.7(c) es dominante. Si en la Fig.5.7(a) consideramos las oscilaciones de fondo ubicados en los tres máximos, podemos inferir que la distancia es del orden de $\sim 4 \mu\text{m}$. En la Fig.5.7(c) se superpone el espectro medido de la estructura cuando aún estaba sobre el sustrato. Puede apreciarse claramente que existe un corrimiento al rojo del espectro de la estructura sobre el sustrato con respecto al espectro medido de la estructura colgada de la punta. Esto es compatible con la idea de que el sustrato interactúa con la estructura, ya que la sonda plasmónica es afectada por su imagen sobre el sustrato. Según nuestro conocimiento esta es la primera medición directa del espectro de una sonda plasmónica en operación y de un corrimiento al rojo por interacción con el sustrato.

5.3. Conclusiones

En este capítulo se presentó el proceso completo de fabricación y caracterización óptica *in-situ* de sondas plasmónicas basadas en una microesfera dieléctrica decorada con nanopartículas metálicas. Todo el procedimiento se llevó a cabo en un solo

instrumento que combina la microscopía óptica con la microscopía de fuerza atómica.

Se lograron relevar los espectros de la sonda en operación a distintas alturas sonda-muestra y se detectó el corrimiento al rojo del espectro de la sonda plasmónica por la interacción con el sustrato.

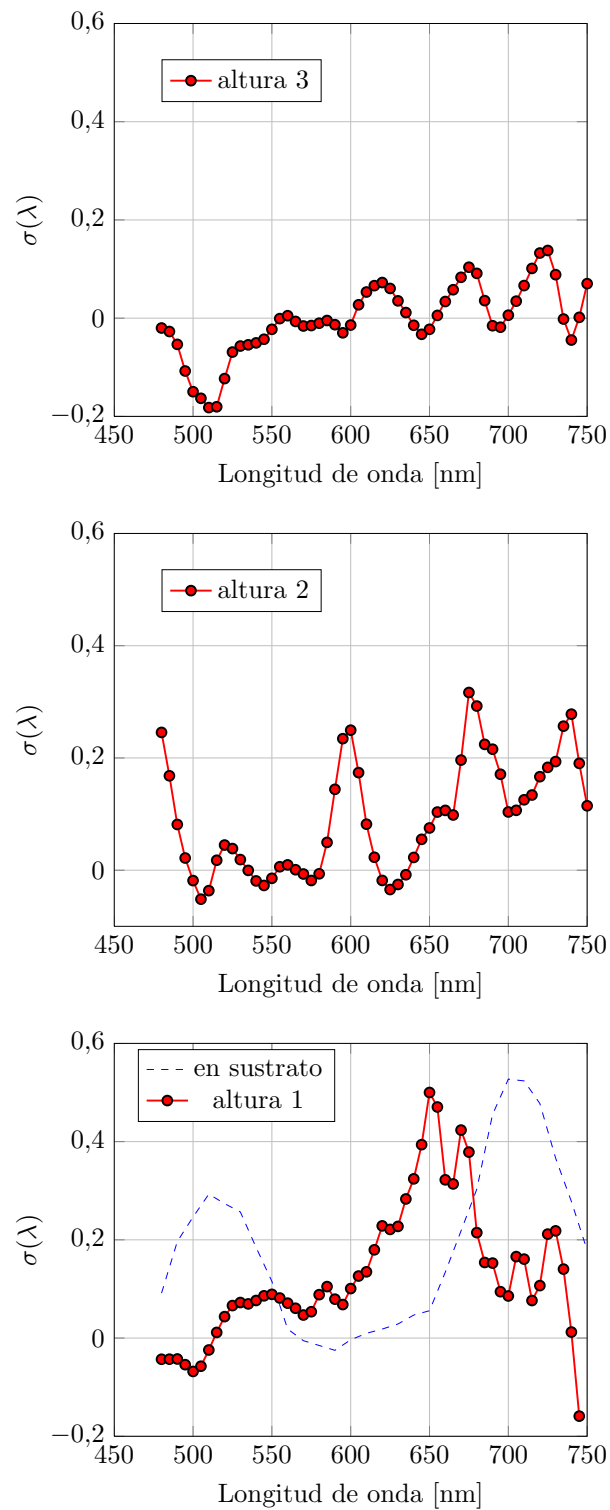


Figura 5.7.: Espectros de las sondas plasmónicas a distintas alturas de la sonda sobre la muestra. A partir de las oscilaciones observadas se puede inferir que las distancias son 4 μm , 3 μm , 2 μm .

Capítulo 6.

Microscopio Combinado: Resultados en biología

Hemos visto hasta aquí aplicaciones a la plasmónica del microscopio desarrollado, principalmente utilizado en el modo de detección confocal espectral. En esta sección presentamos resultados utilizando la configuración AFM y fluorescencia *wide-field*. El sistema biológico estudiado en células son distintas proteínas constituyentes de las adhesiones, y un receptor de membrana como es el receptor de insulina.

6.1. Introducción y motivación

En el marco de una colaboración con la Dra. Lía Pietrasanta participamos del proyecto de mecanotransducción celular (transducción de fuerzas en señales bioquímicas) cuyo objetivo es estudiar la estructura, mecánica y dinámica de las adhesiones focales en células vivas mediante una combinación de microscopías de alta resolución.

Las fuerzas mecánicas tienen un rol importante en la organización, crecimiento, maduración y función de los tejidos [Kim et al., 2010]. A nivel celular, muchas de las respuestas biológicas a las fuerzas externas se originan en dos tipos de estructuras especializadas: adhesiones focales (célula-matriz extracelular) y uniones adherentes (célula-célula). La regulación de la adhesión celular es necesaria para permitir que las células se puedan adaptar a los cambios en las condiciones del medio que ocu-

rren durante la migración, morfogénesis, reparación de heridas y en varios pasos de la invasión tumoral y metástasis [Discher et al., 2005] [Vogel and Sheetz, 2006] [Menon et al., 2011]. Las adhesiones focales (AFs) son complejos de proteínas que unen la matriz extracelular (ECM), a través de los receptores de membrana de la familia de integrinas, a componentes del citoesqueleto. El agregado de integrinas promueve el reclutamiento de varias proteínas (talina, vinculina, alfa-actinina, zyxina y FAK) en sus dominios citoplasmáticos, lo que hace que las integrinas queden unidas mecánicamente a la proteína actina del citoesqueleto. De esta manera las AFs establecen una conexión entre la ECM y el citoesqueleto, y sirven como puntos de tracción para la célula. Las AFs son estructuras transientes planas, alargadas de unos pocos micrones cuadrados que funcionarían como organelas de señalización en el proceso de mecanotransducción celular. En respuesta a señales mecánicas externas, las adhesiones focales funcionan como transductores moleculares capaces de disparar distintas cascadas de señalización bioquímicas intracelulares que tienen influencia en los procesos celulares.

Una manera de explorar la regulación dinámica de los contactos adhesivos y de la arquitectura del citoesqueleto de las células, así como también su influencia en las actividades celulares, es estudiar la relación entre una fuerza local aplicada a la célula y el ensamblado, mecánica y dinámica de las adhesiones focales. Es necesario entonces contar con microscopías de alta resolución y con sistemas que permitan realizar mediciones de fuerza a nivel de sitios de adhesión únicos. Este es el motivo por el cual desarrollamos un microscopio que combina tecnologías de alta sensibilidad para examinar y detectar cambios bioquímicos-físicos en células vivas.

El AFM es una herramienta ideal para monitorear interacciones entre moléculas individuales en su estado nativo porque brinda resolución espacial en el orden de subnanómetros, resolución temporal de milisegundos y ofrece la posibilidad de sensar fuerzas en el orden de picoNewtons [Engel and Müller, 2000]. Avances recientes en la aplicación de esta nanoscopía a la observación y manipulación de biomoléculas son el resultado del mejoramiento de métodos de preparación de las muestras [Mou et al., 1995], de las condiciones de adquisición de la

imagen [Möller et al., 1999], y de continuos desarrollos en instrumentación aplicada [Horber and Miles, 2003] [Fantner et al., 2006] [Schitter et al., 2007]. Por otra parte, la espectroscopía de fuerza FS-AFM ha permitido una visión más profunda de la energética de transiciones de fase, cambios conformacionales [Braun et al., 2006], y del desplegado de moléculas únicas con una sensibilidad de piconewtons y una precisión de subnanómetros en la localización espacial. La combinación de espectroscopía y microscopía de fuerza a nivel de molécula única ha permitido explorar la relación reconocimiento molecular-propiedades dinámicas de las biomoléculas. Así se ha obtenido información única sobre estructura superficial, plegado de proteínas [Oesterhelt et al., 2000] e interacción proteína-proteína [Frank and Hofbauer, 2009] [Hinterdorfer and Dufrene, 2006].

A nivel de células vivas el AFM permite no sólo la observación de estructuras celulares con alta resolución, sino también la evaluación de las propiedades micromecánicas de la célula, y la posibilidad de seguir procesos y dinámica celular [You and Yu, 1999]. Los cambios espaciales y temporales de las propiedades mecánicas en células vivas reflejan los complejos procesos fisiológicos que están presentes en la célula. Desde el punto de vista de la biofísica, el potencial de AFM para monitorear múltiples señales y manipular procesos en la superficie de la célula es ampliado si se lo combina con microscopía óptica de fluorescencia [Pfister et al., 2005]. Con el microscopio combinado presentado en este trabajo se pueden, en principio, iniciar localmente reacciones biológicas mientras se observan cambios conformacionales y funcionales a nivel molecular y celular, cubriendo dos escalas muy diferentes que no pueden ser abarcadas por una sola microscopía.

Debido a la naturaleza compleja de las células, caracterizar las propiedades mecánicas es un gran desafío. La gran heterogeneidad en la estructura y en la composición de las células requiere de estudios en una escala de tiempo que van desde décimas de segundo hasta los minutos y días, y las mediciones se deben hacer en condiciones fisiológicas [Huang et al., 2004]. Distintas técnicas han sido usadas para estudiar cómo la mecánica de las células regula la forma celular, señalización y función [Sniadecki et al., 2006] [Salaita et al., 2007] [Hu et al., 2004]. Las técnicas combina-

das de la plataforma desarrollada nos permitirán visualizar complejos multiprotéicos en las células, perturbar externamente la superficie de la célula, modificar las propiedades fisicoquímicas del soporte donde se adhieren las células, detectar las fuerzas generadas en la célula y observar la respuesta global de la célula en las distintas condiciones. Los estudios realizados con el microscopio combinado se complementan con sistemas ópticos y AFM convencionales.

La estrategia general para analizar la formación y el ensamblado de las adhesiones focales es expresar en células vivas las distintas proteínas adhesivas fusionadas a proteínas fluorescentes (VFP, *visible fluorescent proteins* como GFP).

6.2. Microscopio combinado para aplicaciones en biología celular

Como mencionamos anteriormente, AFM es una herramienta útil en biología molecular y celular, que permite la visualización topográfica del sistema en estudio así también como la medición de fuerzas de interacción entre moléculas. Por otro lado, la microscopía de fluorescencia es una herramienta esencial para el estudio de sistemas biológicos, con la cual se puede visualizar y localizar proteínas en distintas organelas de una célula mediante sondas y proteínas fluorescentes. La combinación de estas herramientas, AFM-Microscopía de fluorescencia, nos permite encarar el estudio de procesos celulares complejos donde un estímulo mecánico externo se traduce en una respuesta bioquímica, la cual podemos seguir en el tiempo.

Entonces, con el objetivo de estudiar la dinámica de las proteínas de las adhesiones focales en respuesta a un estímulo mecánico, pusimos a punto varios aspectos tanto del sistema biológico como de las técnicas de AFM y microscopía confocal de fluorescencia. Trabajando en los microscopios convencionales ganamos experiencia caracterizando el sistema biológico y utilizando técnicas específicas de fluorescencia, aspectos que deben ser trasladados al microscopio combinado.

En el Cap.3 hemos presentado el microscopio AFM de la plataforma construida y se han mostrado varias imágenes adquiridas. En esta sección presentamos resul-

tados que corroboraron el buen desempeño de la plataforma, presentando imágenes combinadas de AFM y fluorescencia *wide field* en dos líneas celulares: 1) células HC11 expresando las proteínas adhesivas zyxina y FAK fusionadas a la proteína fluorescente verde GFP, GFP-zyxina y GFP-FAK, y 2) células HeLa expresando la isoforma B del receptor de insulina fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP-IRB1). A los resultados de la puesta a punto y caracterización del sistema biológico, sumamos la determinación de la cinética de disociación de las proteínas zyxina y FAK mediante la técnica de recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo, experimentos realizados por microscopía confocal.

Los resultados presentados en esta sección son parte de las etapas de desarrollo del proyecto diseñado para realizar los experimentos donde integraremos el estímulo mecánico local y la respuesta bioquímica a nivel de las adhesiones focales.

Estos experimentos no son sencillos y requieren de etapas de preparación previa.

Visualización y localización de distintas proteínas mediante el microscopio combinado

En la Fig.6.1 se muestra una imagen de topografía, adquirida en modo intermitente, de células HC11 que fueron cultivadas y luego fijadas químicamente con paraformaldehído (PFA) de acuerdo a los protocolos presentados en el apéndice A. Se pueden observar en la figura 6.1 muchos detalles; en la parte central se observa una célula completa y a su alrededor se pueden ver células vecinas. Observamos la región del núcleo algo desplazada del centro celular y una superficie que presenta agujeros. Los mismos serían producto de la fijación química. En la Fig.6.2 se observa una imagen de topografía de una región de la Fig.6.1 y en la Fig.6.3 se muestra una región de la Fig.6.2. En la Fig.6.2 se pueden observar los filopodios (prolongaciones que utiliza la célula para explorar el medio ambiente) de las células que aparecen en la imagen de la Fig.6.1.

En la Fig.6.4 se muestra un perfil de topografía de uno de los filopodios que se pueden ver en la Fig.6.2. El perfil medido muestra que, en ese lugar, el filopodio escogido tiene una altura de 40 nm. Esto muestra que el microscopio AFM construido

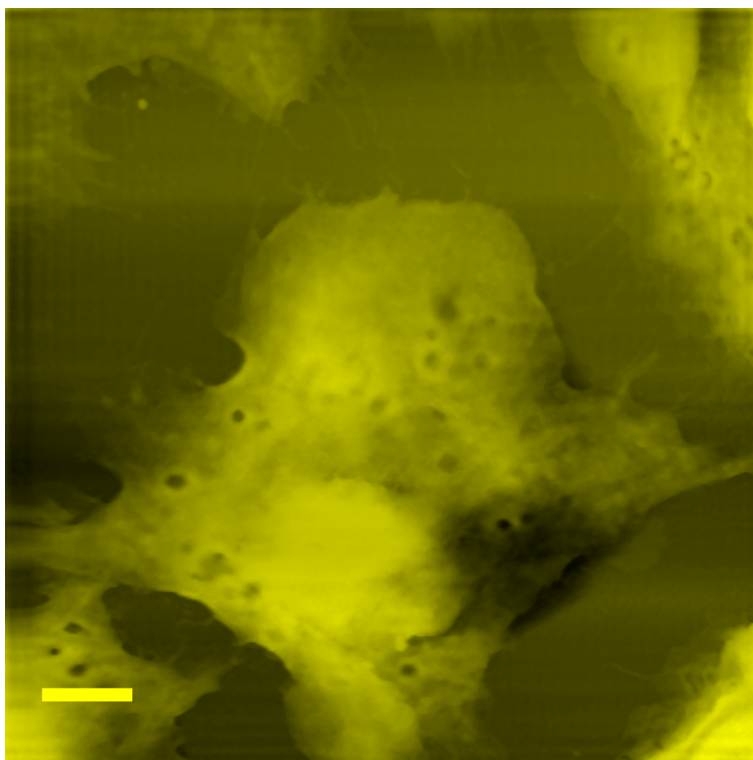


Figura 6.1.: Imagen topográfica de una célula HC11 fijada químicamente. La barra indica 5 μm .

permitirá realizar mediciones muy localizadas sobre las células.

En otro experimento, pudimos observar mediante fluorescencia la distribución y localización de la proteína zyxina fusionada a GFP, proteína que forma parte de las AFs. En la Fig.6.5(a) se muestra una imagen de fluorescencia de una célula HC11 expresando GFP-Zyxina, en la que se puede ver que la proteína está localizada en las adhesiones focales. En la Fig.6.5(b) se muestra una imagen en la que están superpuestas las imágenes de campo brillante y de fluorescencia de la misma célula.

Para validar la versatilidad del instrumento extendimos las mediciones a otra línea de cultivo, células HeLa, que expresan en la membrana plasmática la isoforma B del receptor de insulina. Los receptores de insulina (IR), como muchos otros receptores que están en la membrana celular, le permiten a la célula responder ante estímulos externos generando cascadas de señalización bioquímicas que concluyen, por ejemplo, en la expresión de un determinado gen.

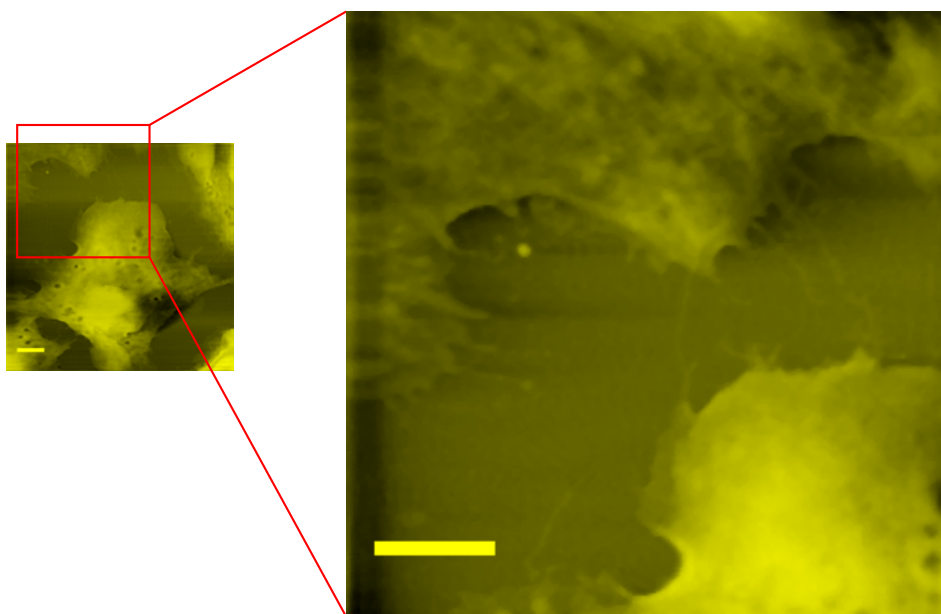


Figura 6.2.: Imagen utilizando la señal error de una región de la imagen de la Fig.6.1.
La barra indica 3 μm .

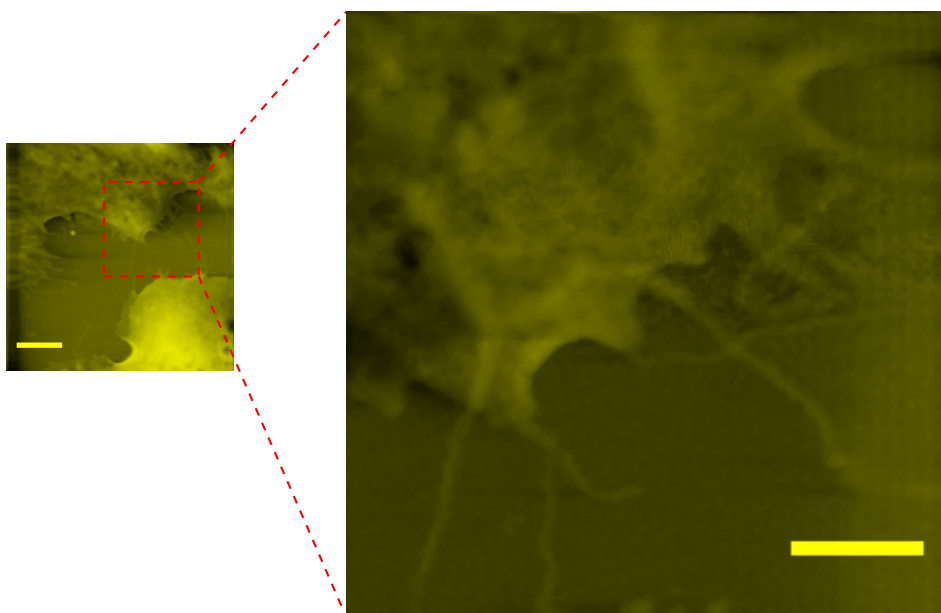


Figura 6.3.: Imagen utilizando la señal error de una región de la imagen de la Fig.6.2.
La barra indica 3 μm .

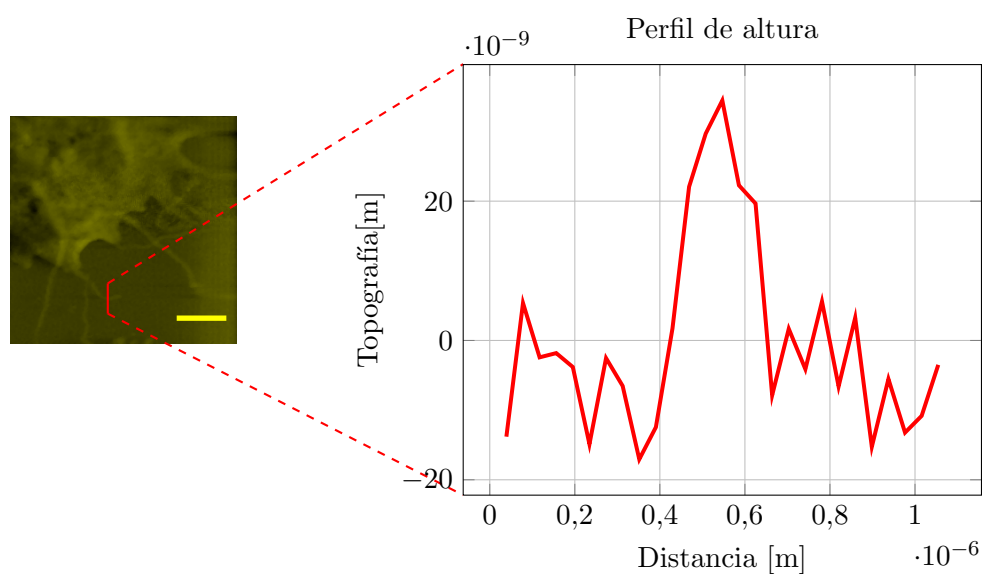


Figura 6.4.: Perfil de topografía de uno de los filopodios que se pueden ver en la Fig.6.3.

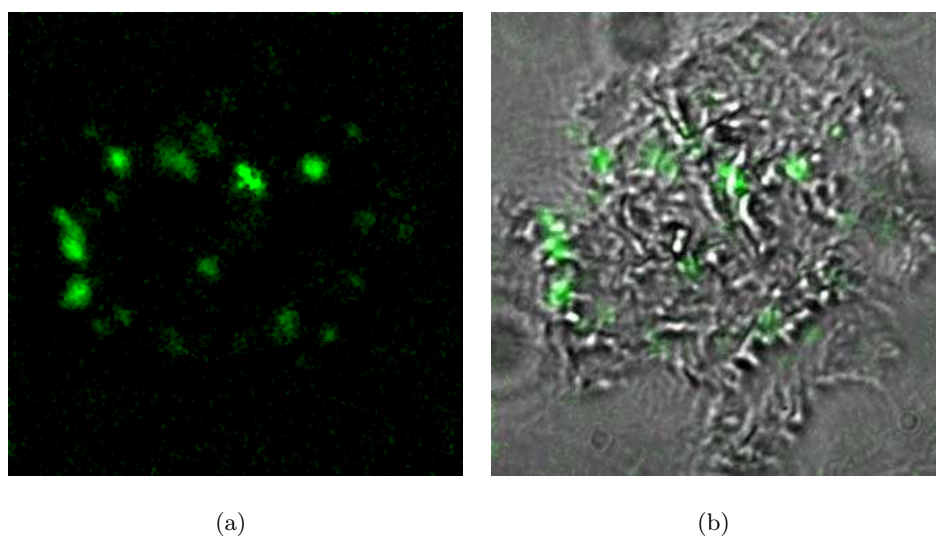


Figura 6.5.: Imágenes de una célula HC11 transfectada con zyxina. 6.5(a) Fluorescencia. 6.5(b) campo brillante y fluorescencia superpuestos.

Las células con las que trabajamos son células HeLa cultivadas, transfectadas y fijadas por la Lic. Jimena Giudice [Giudice, 2011], cuyas directoras de beca son la

Dra. Elizabeth Jares-Erijman y la Dra. Lía Pietrasanta (Laboratorio de Biofísica Molecular, CM1, FCEN). La baja cantidad de receptores de insulina presentes en las células (5000 aproximadamente) hace necesario sobre-expresarlos para poder realizar los estudios. Para poder localizar las células que fueron transfectadas y, por lo tanto sobre-expresan la isoforma B del receptor de insulina (IBR1), se transfectó el receptor fusionado a GFP. Esta proteína fluorescente absorbe luz alrededor de los 480 nm y emite luz alrededor de los 510 nm. El nivel de transfección observado en fué del ~ 10 % [Giudice, 2011].

Las imágenes que presentamos son imágenes de epi-fluorescencia *wide-field* de las células, imágenes de transiluminación de las células y el sensor de fuerza sobre ellas (lo que permite ubicarlo sobre la célula de interés), e imágenes de microscopía AFM de las células seleccionadas.

En la Fig.6.6 se puede ver una imagen de campo brillante por transiluminación de una región una muestra compuesta por células HeLa fijadas químicamente con PFA. En la misma imagen se puede ver el sensor de AFM sobre ellas. El microscopio combinado construido permite ubicar una región de interés de la muestra utilizando la cámara CCD y posicionar sobre ella la punta de AFM (esto solo se encuentra en los microscopios AFM más modernos). En la Fig.6.7 se presentan imágenes de AFM, de fluorescencia y de transmisión de células HeLa que fueron transfectadas para expresar GFP-IRB1. Como se puede ver en la imagen de fluorescencia de la Fig.6.7, de cinco células que se observan hay solo una que expresa la fusión GFP-IRB1. En la Fig.6.8 se muestra una imagen de topografía AFM de la célula que expresa GFP-IRB1.

El poder de identificar las células transfectadas, y por lo tanto las proteínas de interés, y el poder ubicar el sensor de AFM sobre esas células marcadas, es una característica fuerte del microscopio combinado que lo hacen una herramienta poderosa para trabajar con sistemas biológicos y para llevar adelante experimentos de mecanotransducción.

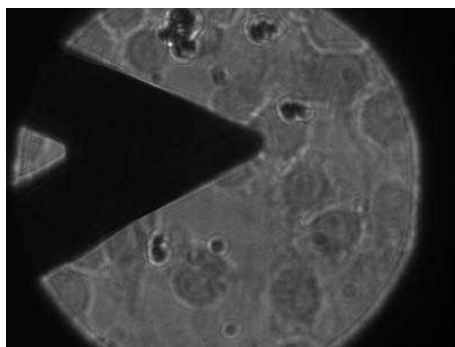


Figura 6.6.: Imagen que muestra el sensor de fuerza sobre un conjunto de células.

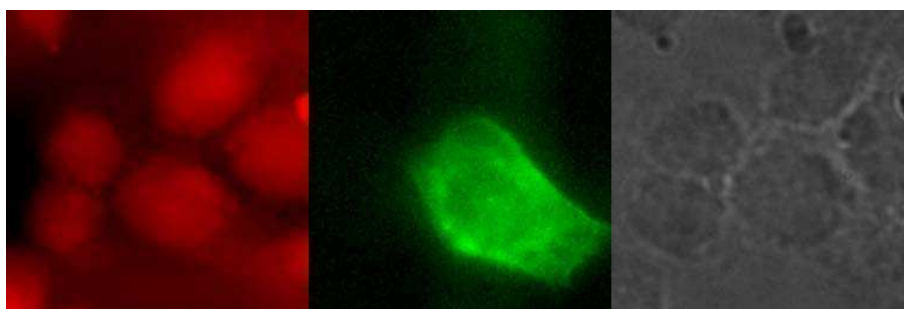


Figura 6.7.: Imagen que muestra, de izquierda a derecha, imágenes de AFM, de fluorescencia y de campo brillante, de un conjunto de células HeLa transfectadas con GFP-IRB1.

6.3. Expresión y localización de las proteínas de fusión EGFP-Zyxina, y FAK en células HC11 mediante microscopía confocal de fluorescencia

Como sistema biológico utilizamos células epiteliales mamarias de ratón. El cultivo de la línea celular HC11 lo realizamos en el Laboratorio de Biofísica Molecular codirigido por la Dra. Lía Pietrasanta (desde el mantenimiento de las células congeladas hasta la transfección).

Como primer paso en la puesta a punto del sistema biológico crecimos las células sobre cubreobjetos cubiertos con proteínas de matriz extracelular como son fibronectina y colágeno. Hemos encontrado que sobre los recubrimientos de colágeno las

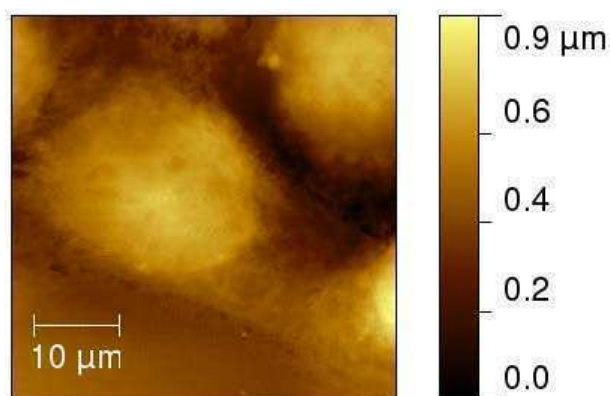


Figura 6.8.: Imagen AFM de la célula HeLa que se ve en la imagen de fluorescencia de la Fig.6.7.

células crecen mejor y desarrollan bien las adhesiones focales. Transfectamos las células utilizando lipofectamina con vectores de expresión que codifican la expresión de la proteína fluorescente EGFP (es una variante mejorada de GFP, con pico de excitación en ~ 490 nm y pico de emisión en ~ 510 nm) fusionada con Zyxina y FAK, que son proteínas específicas de las adhesiones focales. Para llevar control de la eficiencia de transfección y expresión de las proteínas fluorescentes utilizamos un microscopio confocal Olympus FV1000. Observamos las células 24hs después de la transfección. En la Fig.6.9 se muestran imágenes fluorescencia confocal y de transmisión, de células HC11 vivas (en medio de cultivo RPMI 1640 con HEPES) que expresa la fusión EGFP-Zyxina. En la Fig.6.9(a) se puede ver que alrededor de la célula transfectada, que se observa en la Fig.6.9(b), se encuentran otras células que no fueron transfectadas. Se pudo determinar que el porcentaje de células transfectadas es de un $\sim 15\%$. En las figuras 6.9(d), 6.9(e) y 6.9(f) se muestran imágenes confocales de una célula viva que expresa EGFP-FAK.

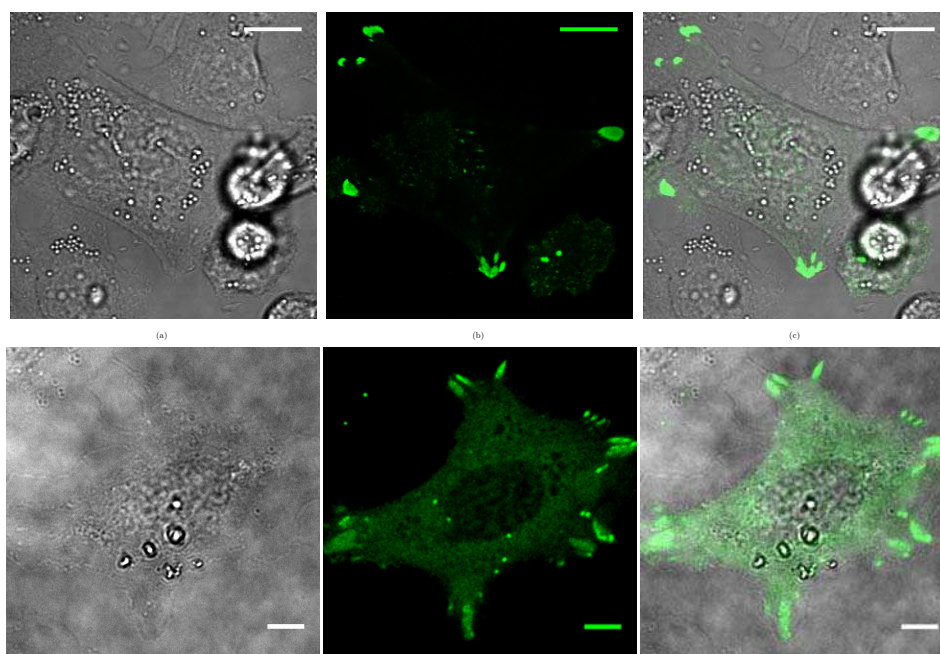


Figura 6.9.: Imágenes confocales de fluorescencia de células HC11 vivas. Arriba: (a) transmisión, (b) fluorescencia EGFP-Zyxina, (c) superposición de (a) y (b). Abajo: (d) transmisión, (e) fluorescencia EGFP-FAK y (f) superposición de (d) y (e). Las barras equivalen a 5 μm .

6.4. Análisis por FRAP de las propiedades de unión de proteínas las adhesiones focales en clulas HC11

Una vez que pusimos a punto el cultivo de la línea celular y la expresión de las proteínas adhesivas quimeras, realizamos mediciones de cinética unión de las proteínas zyxina y FAK en las adhesiones focales. El estudio de la cinética de unión de las proteínas de la adhesión ante un estímulo mecánico puede aportar información acerca de su función e intervención en el ensamblado o desarmado de la adhesión [Lele et al., 2006]. Como herramienta para estudiar la cinética molecular utilizamos una técnica de microscopía óptica llamada FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) [Axelrod et al., 1976]. La técnica FRAP consiste en observar la recuperación de la fluorescencia de una región de una muestra que ha sido foto-

blanqueada (el fotoblanqueo consiste en desactivar la fluorescencia de un fluoróforo utilizando luz; la cantidad de luz necesaria para lograr el blanqueo depende de cada proteína, para las cuales la cantidad de ciclos de excitación-emisión varía). En la Fig.6.10 se muestra un esquema de la técnica FRAP, el experimento comienza con un registro de imágenes de fluorescencia pre-blanqueo, luego se produce el blanqueo iluminando la región de interés (ROI) durante un período de tiempo corto pero con alta intensidad de láser, y luego se registra una serie de imágenes de fluorescencia post-blanqueo de la región completa de la muestra, a partir de las cuales se mide la intensidad de fluorescencia de la ROI en función del tiempo, y de allí utilizando un modelo de difusión, se determinan las constantes cinéticas moleculares. En la parte C de la Fig.6.10 se esquematiza una curva de recuperación de fluorescencia luego del fotoblanqueo, en la que se pueden distinguir la intensidad anterior al blanqueo I_0 , la intensidad inmediatamente seguida al fotoblanqueo I_b y la intensidad alcanzada al final de la recuperación I_m . En la función de recuperación del esquema se muestra una diferencia entre la intensidad de fluorescencia antes del blanqueo y la intensidad al final de la recuperación, esto puede o no ser así, dependiendo de las proteínas y del sistema, y está asociada a la cantidad de moléculas que están fijas en la región blanqueada.

Los experimentos de FRAP de este trabajo están realizados sobre adhesiones focales individuales y la dinámica que comenzamos a estudiar es la dinámica de las proteínas que hemos transfectado, la zyxina y la FAK. Las adhesiones focales tienen un área aproximada de $1 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$, por lo que la ROI que utilizamos es el área de blanqueo dada por el spot del láser sobre la adhesión, que es menor a un micrón cuadrado. El modelo de difusión e interacción para las proteínas que hemos estudiado tiene en cuenta que la difusión de las moléculas en el citosol es mucho más rápida que la interacción en la adhesión (lo comprobamos experimentalmente), lo cual nos lleva a la siguiente expresión para la recuperación de la fluorescencia en función del tiempo que sólo depende de la constante de disociación [Lele et al., 2004, Sprague et al., 2004, Klonis et al., 2002]:

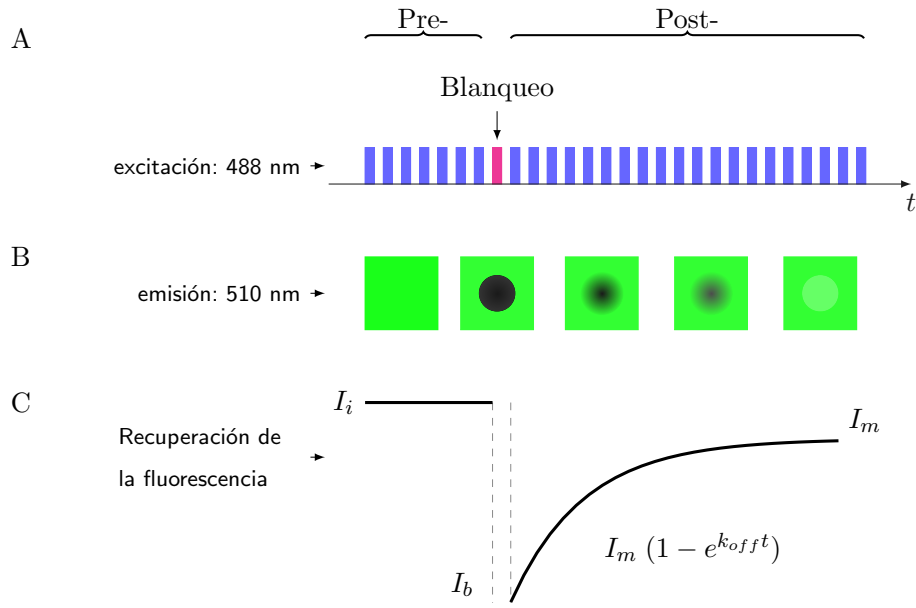


Figura 6.10.: Esquema de la técnica FRAP. Se adquieren imágenes de fluorescencia previas al blanqueo, luego se produce el blanqueo de la región de interés y finalmente se adquieren imágenes de fluorescencia posteriores al blanqueo. A partir de ellas se pueden determinar las constantes de unión molecular.

$$I(t) = I_m(1 - e^{-k_{off}t}). \quad (6.1)$$

En la Ec.(6.1) I_m es la intensidad de fluorescencia alcanzado al final de la recuperación, k_{off} es la constante de disociación de la proteína en la adhesión (es una constante efectiva ya que la proteína estudiada puede interactuar con muchas proteínas presentes en la adhesión focal) y t es el tiempo a partir del fotoblanqueo. Realizando un ajuste de los datos experimentales con la Ec.(6.1) se puede obtener la constante de disociación k_{off} , que nos da información acerca de cuan rápida es la interacción de las proteínas en la adhesión. Utilizando la intensidad luego de la recuperación y la intensidad antes del fotoblanqueo se puede obtener la fracción móvil y la fracción inmóvil de las proteínas fotoblanqueadas,

$$F_m = \frac{I_m - I_b}{I_0 - I_b}, \quad (6.2)$$

$$F_i = 1 - F_m, \quad (6.3)$$

donde F_m es la fracción móvil de moléculas, es decir aquellas que fueron reclutadas desde fuera de la ROI blanqueada, y donde F_i es la fracción de moléculas blanqueadas que no salieron de la ROI, que son las que ocupan un lugar de unión fijo en la adhesión. En la Fig.6.11 se muestran imágenes de un experimento de FRAP realizado sobre una adhesión focal de la célula transfectada con EGFP-Zyxina que se mostró anteriormente en la Fig.6.9(a).

La curva de recuperación experimental, para la proteína FAK, ajustadas con la Ec.(6.1), se muestra en la Fig.6.11 (adhesión focal de la célula de la Fig.6.9(d)).

6.5. Conclusiones

Hemos puesto a punto el microscopio combinado AFM-Microscopía óptica de fluorescencia para aplicaciones biológicas. Logramos obtener imágenes de topografía en modo contacto intermitente de células HC11 fijadas químicamente así como también imágenes de fluorescencia *wide-field* de adhesiones focales en células HC11 que expresan la quimera GFP-Zyxina.

Obtuvimos imágenes simultáneas de AFM y fluorescencia, en este caso las células que utilizamos fueron células HeLa sobreexpresando el receptor de insulina IRB-1 fusionado a GFP, cuya localización es en membrana plasmática.

Visualizamos y localizamos distintas proteínas mediante microscopía confocal. Hemos obtenido por medio de experimentos de FRAP, valores de tiempos de disociación de las proteínas de adhesión Zyxina y FAK en estado de reposo. Estos resultados nos servirán como control para los experimentos que realizaremos en un futuro próximo en el microscopio combinado. En nuestro instrumento tendremos la posibilidad de ejercer fuerza en forma localizada y entonces estudiar la variación de las constantes para cada proteína componente de las adhesiones focales en función de la fuerza.

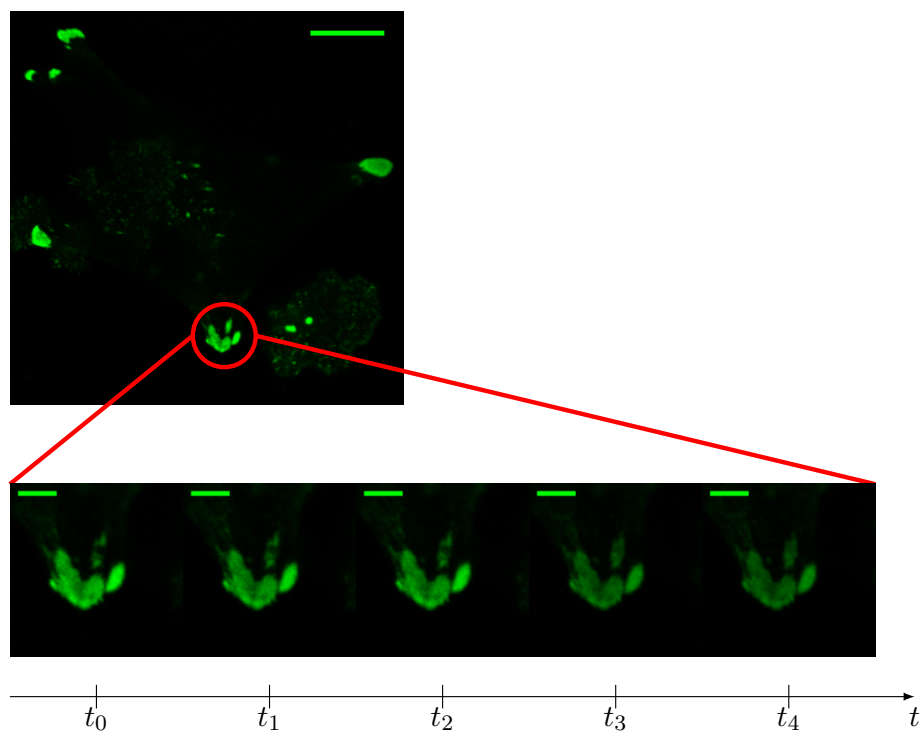


Figura 6.11.: Imágenes correspondientes a un experimento de FRAP sobre una adhesión focal de una célula HC11 que fue transfectada para expresar la fusión EGFP-Zyxina. Se puede ver la recuperación de fluorescencia de la ROI blanqueada en una de las adhesiones focales.

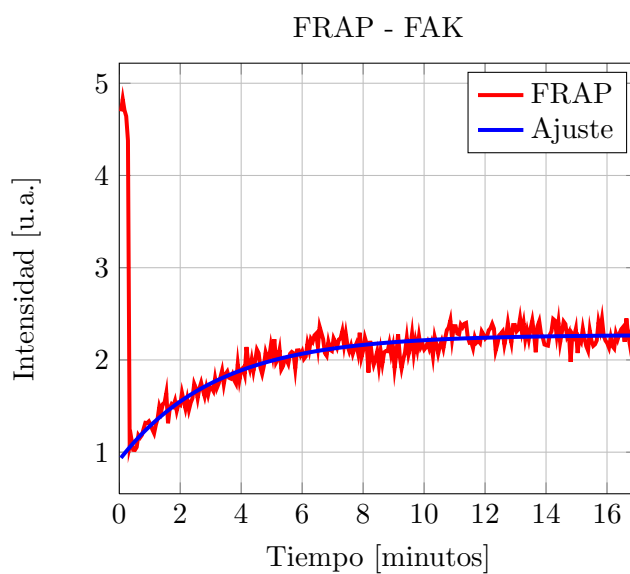


Figura 6.12.: Curva de recuperación correspondiente de un experimento de FRAP sobre una adhesión focal de una célula HC11 que expresa la fusión GFP-FAK. La célula sobre la que se trabajó es la mostrada en la Fig.6.9(e).

Capítulo 7.

Conclusiones y perspectivas

7.1. Conclusiones

En este trabajo hemos presentado el desarrollo de una plataforma de microscopía multipropósito. Esta plataforma está compuesta por un microscopio de fuerza atómica sobre un microscopio óptico invertido. Tanto el cabezal del AFM como el microscopio óptico fueron construidos enteramente en el laboratorio y se armaron sobre una mesa óptica. Se desarrolló una nueva fuente de luz solitónica sintonizable basada en una fibra de cristal fotónico, que está disponible en el microscopio para utilizar como fuente de microscopías multifotónicas. La combinación de estas dos microscopías hizo posible el estudio de sistemas plasmónicos y de sistemas biológicos.

En cuanto a los sistemas plasmónicos, hemos podido caracterizar espectralmente distintos tipos de estructuras plasmónicas únicas. Hemos fabricado *in-situ* sondas para microscopía por intensificación de campo basadas en microesferas de sílice de 700 nm de diámetro recubiertas con nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro. Las hemos caracterizado espectralmente utilizando la parte óptica de la plataforma multipropósito en su modo confocal-espectral, y hemos logrado adherirlas a puntas de AFM. La caracterización espectral de las microesferas decoradas con nanopartículas ha mostrado que el espectro de *scattering*, está dominado por el espectro de las microesferas de sílice y modificado según la estructura plasmónica que forman las nanopartículas que recubren su superficie. Las mediciones espectrales de las sondas plasmónicas son similares a mediciones reportadas en la literatura utilizando otra

técnica. En el microscopio construido se utilizó una fuente de luz blanca basada en una fibra de cristal fotónico para realizar las mediciones espectrales. Para las mediciones espectrales se utilizó el microscopio en configuración confocal. Los espectros fueron medidos adquiriendo imágenes de barrido para distintas longitudes de onda (la salida de la fuente de luz blanca se hizo pasar a través de un monocromador). También se han logrado medir espectros de las sondas plasmónicas fabricadas en función de su distancia al sustrato. En este último experimento hemos logrado mostrar directamente cómo la respuesta espectral de un sistema plasmónico se corre hacia el rojo por la interacción con el sustrato.

Desde el punto de vista de los sistemas biológicos, hemos logrado obtener imágenes combinadas de fuerza atómica y de fluorescencia de células fijadas químicamente. De esta forma logramos conjugar dos escalas espaciales bien distintas, la altísima resolución del AFM junto con el campo visual de la microscopía óptica. La utilización de las dos microscopías hacen de esta plataforma una herramienta poderosa para el estudio de la respuesta molecular de células ante un estímulo mecánico, ya que la microscopía de fluorescencia permite reconocer proteínas de la célula marcadas con un fluoróforo y el AFM permite ubicar la punta (que puede estar modificada químicamente con alguna proteína de la cual se quiera estudiar su interacción con otras proteínas) y realizar mediciones de fuerza.

7.2. Perspectivas

En el marco de los proyectos del desarrollo de sondas plasmónicas, las perspectivas son las de utilizar la plataforma construida para realizar microscopía FESOM. En este sentido, se piensa utilizar el cabezal de AFM con un esquema como el de la Fig.1.1 y realizar la detección utilizando la parte óptica del microscopio, de manera similar a la realizada para obtener los espectros en función de la distancia. De esta forma podemos concentrar la fabricación, la caracterización y la utilización de una sonda plasmónica en un solo microscopio. La ventaja de tener todas las etapas en un único instrumento permite optimizar excitación y la detección de la microscopía FESOM.

En el marco del proyecto del estudio de respuesta a estímulos mecánicos en células vivas, se va a construir una cámara para realizar mediciones bajo líquido (esto es necesario para realizar los experimentos con células vivas). Para la detección óptica de fluorescencia, lo que sigue es utilizar la fuente de luz solitónica sintonizable desarrollada en este trabajo (Cap.2) para realizar mediciones de recuperación de la fluorescencia por dos fotones (MPFRAP), una técnica similar a la presentada en el Cap.6.

Apéndice A.

Cultivo y tratamiento de células HC11

A.1. Cultivo

- Se crecen en placas p60 o p100.
- Dividir cada 3 días aprox antes de que lleguen a confluencia (o apenas llegaron, no dejar varios días en confluencia porque se diferencian).

A.2. Plaqueo

- Retirar medio.
- Lavar con PBS (3ml para p100, 1ml para p60).
- Colocar tripsina (1ml en p100, 400ul en p60)
- 5 minutos en estufa.
- Levantar dispersando con tip.
- Colocar en medio fresco (dilucion mínima de la tripsina 1/10).
- Agitar en forma de cruz.
- Elegir densidad según necesidad. Densidades orientativas: una placa semiconfluente alcanza la misma densidad si se divide al medio y se plaquea en placa del mismo tamaño. Para mantener el cultivo y dividir luego de 3-4 días de

plaquear, colocar 1/6 de la placa. Si se va a plaquear para transfectar en cubre de 25mm colocar 1/5 de una placa p100 semiconfluente.

A.3. Medio de cultivo completo

- RPMI 1640.
- Suero fetal bovino 10 %.
- NaHCO₃ 0,375 % (si fuera necesario, o sea solo si se prepara de medio en polvo, no autoclavar el stock 7,5 %, filtrarlo con 0,2µm para esterilizar).
- Antibiótico.
- Insulina 5 ug/ml (stock 5mg/ml preparado según indicaciones de la hoja de datos según Sigma).
- Colocar 7 ml en placa p100 y 2 ml en placa p60 (o 10 y 4 respectivamente en caso de dejar 3 días sin cambiar medio).

A.4. Plaqueo sobre cubreobjetos (25mm o 10mm)

A.4.1. Esterilización de cubreobjetos

- Colocar los cubreobjetos 15 minutos en alcohol 95 %.
- En el flujo laminar, retirar los cubres con pinza estéril, eliminar el remanente de alcohol apoyando el canto de los cubres en un papel absorbente, colocar los cubres apoyados con inclinación dentro de una placa (de 6 o 24 wells dependiendo de tamaño de cubre) para dejar que se evapore todo el alcohol durante 15 minutos en presencia de luz UV del flujo. Colocar cubres en fondo de la placa.

A.4.2. Coating de cubres con proteínas de matriz extracelular

Fibronectina

- Colocar 300 ul (cubres de 25mm) de solución de fibronectina 5 ug/ml en PBS (stock 1mg/ml en freezer -20).
- Esparcir para cubrir todo el cubre.
- Tapar la placa, dejar 30 minutos dentro de flujo sin UV, retirar líquido y colocar medio completo (no dejar secar la fibronectina).

Colágeno

- Idem fibronectina pero utilizando una solución de colágeno 50 ug/ml preparada en el momento a partir de una madre 1 mg/ml en ácido acético 0,1M (se esteriliza con cloroformo según indicaciones de la hoja de datos de Sigma, se guarda a 4° C). La dilución de la madre se realiza con ácido acético 0,02M (filtrado con 0,2 um). Se deja al menos 1 hora en flujo con placa destapada hasta que se seque el líquido o se retira el exceso de líquido, y se coloca medio completo.

A.5. Transfección

- Retirar medio.
- Lavar 2 veces con PBS (1ml p60 o cubre en p6, 500ul cubre en p24).
- Colocar medio transfección (800 ml p60 o cubre en p6, 400ul cubre en p24).
- Guardar en estufa.
- Colocar medio transfección en 2 tubos eppendorf (rotulados L y D, 100ul p60, 50 ul cubre en p6, 25ul cubre en p24).
- Agregar lipofectamina a tubo L (4ul p60 o cubre en p6, 1 ul cubre en p24).
- Agitar suavemente.

- Agregar DNA plasmídico a tubo D (aprox 1-2ug p60 o p6 y 0,5 ug en p24), agitar suavemente.
- Esperar 5 minutos.
- Mezclar ambos tubos colocando gota a gota (y mezclando entre gotas con golpecitos suaves) el contenido del tubo D sobre el del tubo L.
- Esperar 20 minutos.
- Colocar la mezcla en la placa de células con medio de transfección.
- Agitar suavemente la placa.
- Esperar 5-6 hs preferentemente o dejarlo durante la noche.
- Cambiar a medio completo.

A.6. Medio de transfección

- Idem medio completo pero sin suero ni antibiótico. También se puede utilizar Optimem.

A.7. Fijación

- Fijar las células en 3.7 PFA durante 20 minutos en hielo.
- Luego rehidratar en 10 mM de Tris-HCl pH7.
- Lavar con PBS.
- Cubrir con PBS.

Apéndice B.

Acronismos

AFM Atomic Force Microscopy

AOM Acousto-Optic Modulator

CCD Charge Coupled Device

DDA Discrete Dipole Approximation

ECM Extra Cellular Matrix

FESOM Field Enhanced Scanning Near Field Optical Microscopy

FS Force Spectroscopy

FWHM Full Width at Half Maximum

GVD Group Velocity Dispersion

NLSE Nonlinear Schrödinger equation

ME Micro Esferas

MED Micro Esferas Decoradas

NPs Nanopartículas

NSR Non-Solitonic Radiation

OSA Optical Spectrum Analyzer

PCF Photonic Crystal Fiber

PSF Point Spread Function

RIFS Raman Induced Frequency Shift

SEM Scanning Electron Microscopy

SNOM Scanning Near Field Optical Microscopy

SPM Scanning Probe Microscopy

STM Scanning Tunnel Microscopy

Bibliografía

- [Agrawal, 2001] Agrawal, G. P. (2001). *Nonlinear fiber optics*. Academic Press, segunda edition.
- [Axelrod et al., 1976] Axelrod, D., Koppel, D., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical journal*, 16(9):1055–1069.
- [Binnig et al., 1986] Binnig, G., Quate, C., and Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical review letters*, 56(9):930–933.
- [Binnig et al., 1982] Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., and Weibel, E. (1982). Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters*, 49(1):57–61.
- [Blow and Wood, 1989] Blow, K. and Wood, D. (1989). Theoretical description of transient stimulated Raman scattering in optical fibers. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 25(12):2665–2673.
- [Bohren and Huffman, 1983] Bohren, C. F. and Huffman, D. R. (1983). *Absorption and scattering of light by small particles*. John Wiley and Sons, Inc.
- [Bouhelier, 2006] Bouhelier, A. (2006). Field-enhanced scanning near-field optical microscopy. *Microscopy research and technique*, 69(7):563–579.
- [Bragas and Martínez, 1998] Bragas, A. and Martínez, O. (1998). Field enhanced scanning optical microscopy.

- [Braun et al., 2006] Braun, T., Backmann, N., Vögtli, M., Bietsch, A., Engel, A., Lang, H., Gerber, C., and Hegner, M. (2006). Conformational change of bacteriorhodopsin quantitatively monitored by microcantilever sensors. *Biophysical journal*, 90(8):2970–2977.
- [Caldarola et al., 2011] Caldarola, M., Bettachini, V., Rieznik, A., König, P., Masip, M., Grosz, D., and Bragas, A. (2011). Robust and compact pcf-based femtosecond soliton tunnable source. *Optics Communications*.
- [Chalfie et al., 1994] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., Prasher, D., et al. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148):802–805.
- [Costantino et al., 2001] Costantino, S., Libertun, A., Campo, P. D., Torga, J., and Martinez, O. (2001). Fast scanner with position monitor for large optical delays. *Optics Communications*, 198:287–291.
- [Delanoë-Ayari et al., 2010] Delanoë-Ayari, H., Brevier, J., and Riveline, D. (2010). Scaling concepts in cell physics: paradigms for cell adhesion. *Soft Matter*.
- [Discher et al., 2005] Discher, D., Janmey, P., and Wang, Y. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751):1139.
- [Engel and Müller, 2000] Engel, A. and Müller, D. (2000). Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(9):715–718.
- [Fantner et al., 2006] Fantner, G., Schitter, G., Kindt, J., Ivanov, T., Ivanova, K., Patel, R., Holten-Andersen, N., Adams, J., Thurner, P., Rangelow, I., et al. (2006). Components for high speed atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 106(8-9):881–887.
- [Frank and Hofbauer, 2009] Frank, I. and Hofbauer, F. (2009). Single-molecule mechanics: Breaking bonds at a stretch. *Nature Chemistry*, 1(3):180–181.

- [Gan, 2007] Gan, Y. (2007). Invited Review Article: A review of techniques for attaching micro-and nanoparticles to a probe's tip for surface force and near-field optical measurements. *Review of Scientific Instruments*, 78:081101.
- [Giudice, 2011] Giudice, J. (2011). PhD thesis, FCEyN, UBA.
- [Gordon, 1986a] Gordon, J. (1986a). Theory of the soliton self-frequency shift. *Optics Letters*, 11(10):662–664.
- [Gordon, 1986b] Gordon, J. P. (1986b). Theory of the soliton self-frequency shift. *Optics Letters*, 11:662.
- [GPIB,] GPIB. <http://www.ni.com/pdf/manuals/370428c.pdf>.
- [Hasegawa and Tappert, 1973] Hasegawa, A. and Tappert, F. (1973). Transmission of stationary nonlinear optical pulses in dispersive dielectric fibers. i. anomalous dispersion. *Applied Physics Letters*, 23(3):142.
- [Herrmann et al., 2002] Herrmann, J., Griebner, U., Zhavoronkov, N., Husakou, A., Nickel, D., Knight, J., Wadsworth, W., Russell, P., and Korn, G. (2002). Experimental evidence for supercontinuum generation by fission of higher-order solitons in photonic fibers. *Physical review letters*, 88(17):173901.
- [Hinterdorfer and Dufrêne, 2006] Hinterdorfer, P. and Dufrêne, Y. (2006). Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nature Methods*, 3(5):347–355.
- [Horber and Miles, 2003] Horber, J. and Miles, M. (2003). Scanning probe evolution in biology. *Science*, 302(5647):1002.
- [Hu et al., 2004] Hu, S., Eberhard, L., Chen, J., Love, J., Butler, J., Fredberg, J., Whitesides, G., and Wang, N. (2004). Mechanical anisotropy of adherent cells probed by a three-dimensional magnetic twisting device. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, 287(5):C1184.

- [Huang et al., 2004] Huang, H., Kamm, R., and Lee, R. (2004). Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, 287(1):C1.
- [Husakou and Herrmann, 2001] Husakou, A. and Herrmann, J. (2001). Supercontinuum generation of higher-order solitons by fission in photonic crystal fibers. *Physical Review Letters*, 87(20):203901.
- [Kasas and Dietler, 2008] Kasas, S. and Dietler, G. (2008). Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 456(1):13–27.
- [Kim et al., 2010] Kim, J., Dooling, L., and Asthagiri, A. (2010). Intercellular mechanotransduction during multicellular morphodynamics. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(Suppl 3):S341.
- [Klonis et al., 2002] Klonis, N., Rug, M., Harper, I., Wickham, M., Cowman, A., and Tilley, L. (2002). Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics. *European Biophysics Journal*, 31(1):36–51.
- [Kunik et al., 2010] Kunik, D., Aramendia, P., and Martínez, O. (2010). Single photon fluorescent microlithography for live-cell imaging. *Microscopy Research and Technique*, 73(1):20–26.
- [Labview,] Labview. www.ni.com/labview/.
- [Lehoux and Tedgui, 2003] Lehoux, S. and Tedgui, A. (2003). Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *Journal of biomechanics*, 36(5):631–643.
- [Lele et al., 2004] Lele, T., Oh, P., Nickerson, J., and Ingber, D. (2004). An improved mathematical approach for determination of molecular kinetics in living cells with FRAP. *MCB-TECH SCIENCE PRESS-*, 1:181–190.
- [Lele et al., 2006] Lele, T., Pendse, J., Kumar, S., Salanga, M., Karavitis, J., and Ingber, D. (2006). Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells. *Journal of cellular physiology*, 207(1):187–194.

- [Lewis et al., 1984] Lewis, A., Isaacson, M., Harootunian, A., and Muray, A. (1984). Development of a 500 Å spatial resolution light microscope:: I. light is efficiently transmitted through $[\lambda]/16$ diameter apertures. *Ultramicroscopy*, 13(3):227–231.
- [Lindfords et al., 2004] Lindfords, K., Kakbrenner, T., Stoller, P., and Sandoghdar, V. (2004). Detection and spectroscopy of gold nanoparticles using supercontinuum white light confocal microscopy. *PRL*, 92:037401–1.
- [Liu et al., 2001] Liu, X., Xu, C., Know, W. H., Chandalia, J. K., Eggleton, B. J., Kosinski, S. G., and Windeler, R. S. (2001). Soliton self-frequency shift in a short tapered air–silica microstructure fiber. *Opt. Lett.*, 26:358.
- [Mamyshev and Chernikov, 1990] Mamyshev, P. V. and Chernikov, S. V. (1990). Ultrashort-pulse propagation in optical fibers. *Optics letters*, 15(19):1076–8.
- [Martínez et al., 1984] Martínez, O. E., Gordon, J. P., and Fork, R. L. (1984). Negative dispersion using pairs of prisms. *Optics Letters*, 9:150–152.
- [Masip et al., 2009a] Masip, M., Rieznik, A., König, P., Grosz, D., Bragas, A., and Martinez, O. (2009a). Femtosecond soliton source with fast and broad spectral tunability. *Optics letters*, 34(6):842–844.
- [Masip et al., 2009b] Masip, M., Rieznik, A., König, P., Grosz, D., Bragas, A., and Martinez, O. (May 2009b). Soliton laser has broad tunability. *Optics and Lasers Europe*.
- [Masip, 2006] Masip, M. E. (2006). Modelado de nanopartículas y generación de luz blanca. Master’s thesis, Laboratorio de Electrónica Cuántica, Depto. de Física, Universidad de Buenos Aires.
- [Menon et al., 2011] Menon, S., Beningo, K., and Gullberg, D. (2011). Cancer Cell Invasion Is Enhanced by Applied Mechanical Stimulation. *PLoS ONE*, 6(2):1295–1299.

- [Mie, 1908] Mie, G. (1908). Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3):377–445.
- [Mills, 1991] Mills, D. L. (1991). *Nonlinear Optics: basic concepts*. Springer-Verlag.
- [Möller et al., 1999] Möller, C., Allen, M., Elings, V., Engel, A., and Müller, D. (1999). Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces. *Biophysical journal*, 77(2):1150–1158.
- [Mou et al., 1995] Mou, J., Yang, J., and Shao, Z. (1995). Atomic force microscopy of cholera toxin B-oligomers bound to bilayers of biologically relevant lipids. *Journal of molecular biology*, 248(3):507–512.
- [Nicolas et al., 2008] Nicolas, A., Besser, A., and Safran, S. (2008). Dynamics of cellular focal adhesions on deformable substrates: consequences for cell force microscopy. *Biophysical journal*, 95(2):527–539.
- [Nishizawa et al., 1999] Nishizawa, N., Ito, Y., and Goto, T. (1999). Compact system of wavelength-tunable femtosecond soliton pulse generation using optical fibers. *IEEE Photon. Technol. Lett.*, 11:325.
- [Nishizawa et al., 2002] Nishizawa, N., Ito, Y., and Goto, T. (2002). 0.78-0.90- μm wavelength-tunable femtosecond soliton pulse generation using photonic crystal fiber. *IEEE Photon. Technol. Lett.*, 14:986.
- [Nordlander et al., 2004] Nordlander, P., Oubre, C., Prodan, E., Li, K., and Stockman, M. (2004). Plasmon hybridization in nanoparticle dimers. *Nano Letters*, 4(5):899–903.
- [Novotny and Hecht, 2006] Novotny, L. and Hecht, B. (2006). *Principles of nano-optics*. Cambridge Univ Pr.
- [Novotny et al., 1995] Novotny, L., Pohl, D., and Hecht, B. (1995). Scanning near-field optical probe with ultrasmall spot size. *Optics letters*, 20(9):970.

- [Oesterhelt et al., 2000] Oesterhelt, F., Oesterhelt, D., Pfeiffer, M., Engel, A., Gaub, H., and Müller, D. (2000). Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science*, 288(5463):143.
- [Ohtsu and Hori, 1999] Ohtsu, M. and Hori, H. (1999). *Near-field nano-optics: from basic principles to nano-fabrication and nano-photonics*. Plenum Pub Corp.
- [Pelling et al., 2009] Pelling, A., Veraitch, F., Chu, C., Mason, C., and Horton, M. (2009). Mechanical dynamics of single cells during early apoptosis. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(7):409–422.
- [Pfister et al., 2005] Pfister, G., Stroh, C., Perschinka, H., Kind, M., Knoflach, M., Hinterdorfer, P., and Wick, G. (2005). Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *Journal of cell science*, 118(Pt 8):1587.
- [Physik Instrumente,] Physik Instrumente. <http://www.physikinstrumente.com>.
- [Python,] Python. <http://www.python.org>.
- [Ranka et al., 2000] Ranka, J. K., Windeler, R. S., and Stentz, A. J. (2000). Visible continuum generation in air silica microstructure optical fibers with anomalous dispersion at 800 nm. *Optics Letters*, 25:25–27.
- [RHK,] RHK. <http://www.rhk-tech.com>.
- [Rieznik,] Rieznik, A. A. Matlab scripts for complete raman response simulations. <http://photonics.incubadora.fapesp.br/portal/download/ssfm-with-raman>.
- [Royer et al., 1989] Royer, P., Bijeon, J., Goudonnet, J., Inagaki, T., and Arakawa, E. (1989). Optical absorbance of silver oblate particles: Substrate and shape effects. *Surface Science*, 217(1-2):384–402.
- [Ruppín, 1983] Ruppín, R. (1983). Surface modes and optical absorption of a small sphere above a substrate. *Surface Science*, 127(1):108–118.

- [Ruska and Knoll, 1932] Ruska, E. and Knoll, M. (1932). Das Elektronenmikroskop. *Z Phys*, 78:318–339.
- [Salaita et al., 2007] Salaita, K., Wang, Y., and Mirkin, C. (2007). Applications of dip-pen nanolithography. *Nature Nanotechnology*, 2(3):145–155.
- [Saleh and Teich, 2007] Saleh, B. E. A. and Teich, M. C. (2007). *Fundamentals of photonics*. Willey.
- [Sanchez et al., 2002] Sanchez, E., Krug II, J., and Xie, X. (2002). Ion and electron beam assisted growth of nanometric SiO structures for near-field microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 73:3901.
- [Scarpettini, 2011] Scarpettini, A. (2011). *FESOM*. PhD thesis, Laboratorio de Electrónica Cuántica, Dpto de Física, FCEyN, UBA.
- [Scarpettini and Bragas, 2010] Scarpettini, A. and Bragas, A. (2010). Coverage and aggregation of gold nanoparticles on silanized glasses. *Langmuir*, 26:15948–15053.
- [Scarpettini et al., 2009] Scarpettini, A., Pellegrini, N., and Bragas, A. (2009). Optical imaging with subnanometric vertical resolution using nanoparticle-based plasmonic probes. *Optics Communications*, 282(5):1032–1035.
- [Scatterlib,] Scatterlib. <http://code.google.com/p/scatterlib/>.
- [Schitter et al., 2007] Schitter, G., Astrom, K., DeMartini, B., Thurner, P., Turner, K., and Hansma, P. (2007). Design and modeling of a high-speed AFM-scanner. *IEEE Transactions on Control Systems Technology*, 15(5):906–915.
- [Selhuber-Unkel et al., 2008] Selhuber-Unkel, C., López-García, M., Kessler, H., and Spatz, J. (2008). Cooperativity in adhesion cluster formation during initial cell adhesion. *Biophysical journal*, 95(11):5424–5431.
- [Shimomura et al., 1962] Shimomura, O., Johnson, F., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59(3):223–239.

- [Sniadecki et al., 2006] Sniadecki, N., Desai, R., Ruiz, S., and Chen, C. (2006). Nanotechnology for cell–substrate interactions. *Annals of biomedical engineering*, 34(1):59–74.
- [Sprague et al., 2004] Sprague, B., Pego, R., Stavreva, D., and McNally, J. (2004). Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical journal*, 86(6):3473–3495.
- [Stolen et al., 1989] Stolen, R., Gordon, J., Tomlinson, W., and Haus, H. (1989). Raman response function of silica-core fibers. *JOSA B*, 6(6):1159–1166.
- [Synge, 1928] Synge, E. (1928). XXXVIII. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. *Philosophical Magazine Series 7*, 6(35):356–362.
- [Vasile et al., 2009] Vasile, M., Grigg, D., Griffith, J., Fitzgerald, E., and Russell, P. (2009). Scanning probe tips formed by focused ion beams. *Review of Scientific Instruments*, 62(9):2167–2171.
- [Vogel and Sheetz, 2006] Vogel, V. and Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(4):265–275.
- [Xiao et al., 2010] Xiao, M., Chen, H., Ming, T., Shao, L., and Wang, J. (2010). Plasmon-modulated light scattering from gold nanocrystal-decorated hollow mesoporous silica microspheres. *ACS Nano*.
- [You and Yu, 1999] You, H. and Yu, L. (1999). Atomic force microscopy imaging of living cells: progress, problems and prospects. *Methods in cell science*, 21(1):1–17.
- [Zaldivar, 2011] Zaldivar, F. (2011). Sondas plasmónicas.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Andrea por todo lo que me dió, por haberme dado la posibilidad de trabajar con ella, por dejarme aprender, por dejarme crecer. Esta claro, y no está demás decirlo, que sin su apoyo sería imposible que yo estuviese aquí sentado escribiendo estas palabras, infructuosas por cierto en su afán de agradecer todo lo que tengo que agradecer.

Quiero agradecer a Oscar, una persona excepcional, científica y humanamente. Sin su ayuda tampoco hubiera sido posible todo esto.

También quiero agradecer a Lía. Sin ella no hubiese sido posible llevar a cabo los experimentos de biofísica. Lo más importante, es una persona muy generosa y estuvo siempre apoyando, sobre todo en los momentos más difíciles. También quiero agradecer a la Dra. Elizabeth Jares-Erijman que junto con Lía me permitieron trabajar en el Laboratorio de biofísica molecular del Centro Multidisciplinario 1 de nuestra facultad.

Quiero agradecer a todos los que hacen que el LEC sea un muy buen lugar de trabajo, con los que compartí buena parte los últimos cinco años.

Quiero agradecer especialmente a Cata, Gabriela, Fran, Edu, a Darío, a Maxi y a Silvio. Pasé muy gratos momentos ellos.

Quiero agradecer a Santiago Costantino por haberme dejado trabajar con él, porque aprendí mucho, porque me permitió vivir una experiencia inolvidable.

Quiero agradecer a Hernán, con quién también pasé momentos muy gratos. Especialmente quiero agradecerle por haber ayudado cuando tuvimos una pequeña falla técnica que pretendía dejarnos sin microscopio.

Quiero agradecer a Diego Grosz. Lo muy buena persona y profesional que es se tradujo en haber sido un muy buen consejero y muy buen colaborador.

Quiero agradecer a todos, en todos los niveles, en todas las áreas, que construyen y hacen posible el Departamento de Física, la FCEN y la Universidad pública y gratuita en general.

Quiero agradecer a mi familia. A mi mamá. A mi papá. Naturalmente, sin ellos esto no sería posible. Gracias por todo. Gracias también a mis hermanos, que tal vez sin saberlo ayudaron. Gracias abuela también por el apoyo.

Quiero agradecer también a mis amigos, que como mencioné arriba con mis hermanos, tal vez sin saberlo ayudaron.

Finalmente, quiero agradecer a mi amor, Guada. Gracias por aguantarme, por ayudarme, por quererme.