



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

**Diseño y aplicación de microscopías avanzadas para el estudio de
problemas de mecanotransducción celular y nanoplasmónica**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

Martín Caldarola

Directora de tesis: Andrea V. Bragas
Consejero de estudios: Diego F. Grosz
Lugar de trabajo: Laboratorio de Electrónica Cuántica

Fecha de defensa: 30 de Marzo 2015

A mi familia, en especial a Patricia.

Resumen

El estudio de problemas que requieren resolución espacial y especificidad química, en condiciones físico-químicas o biológicas altamente controladas, demanda el desarrollo de herramientas específicas, novedosas, versátiles y de plataforma abierta que permitan la libre elección y control de los parámetros relevantes al problema en cuestión. En esta Tesis se han encarado problemas en campos diversos como son la biofísica y la nanofotónica, pero que utilizan una misma plataforma de microscopía avanzada, adaptada especialmente para cada aplicación.

En el campo de la biofísica, se estudió la dinámica de formación y remodelado de adhesiones focales (FA). Las FAs son complejos multiproteicos que sirven a la célula como puntos de anclaje en la matriz extracelular. Su proceso de formación consta de distintas etapas y escalas temporales que dependen sustancialmente de las fuerzas aplicadas a la célula. Para poder estudiar y entender este complejo proceso, altamente dinámico, es necesario realizar mediciones precisas de las fuerzas involucradas y poder correlacionarlas con la respuesta bioquímica de la célula. Se presenta una técnica que permite obtener información cuantitativa de la respuesta de células vivas a estímulos mecánicos locales y con especificidad molecular, basada en la combinación de un microscopio de fuerza atómica (AFM), con un microscopio óptico de fluorescencia. Con esta técnica se estudiaron proteínas citosólicas presentes en las adhesiones focales, tales como vinculina, FAK y zixina. Se observó la formación de una adhesión focal naciente en el caso de la vinculina, se cuantificó el tiempo de reclutamiento para la FAK y se estudió la distribución espacial de la zixina en adhesiones focales maduras. Estos resultados muestran la utilidad de este desarrollo para el estudio de procesos biofísicos complejos involucrados en la mecanotransducción celular.

En el campo de la nanofotónica y en particular de la nanoplasmónica, las llamadas nanoantenas metálicas han sido ampliamente utilizadas en los últimos años para intensificar y confinar la luz en volúmenes muy pequeños. Sus diversas aplicaciones van desde el sensado molecular hasta las microscopías de alta resolución. La intensificación local del campo electromagnético se debe a la excitación resonante de los llamados plasmones superficiales en los metales nanoestructurados. Sin embargo, uno de los problemas fundamentales de este esquema consiste en la altísima generación de calor en la nanoesacala, producida por la excitación resonante. La plataforma multifunción desarrollada en esta Tesis admite ser utilizada en la configuración de microscopio confocal de doble haz, que permite el control independiente de la generación de calor en la nanoantena, producido por uno de esos haces. La mencionada configuración fue utilizada en dos problemas de nanoplasmónica relacionados: A) el desarrollo y prueba de principios de un nuevo esquema de sensado molecular, que utiliza como mecanismo de sensado el calentamiento plasmónico de nanocilindros de oro y la consecuente dependencia de la intensidad de fluorescencia con la temperatura. B) El desarrollo de un método de mapeo térmico de alta resolución basado en la disminución de la intensidad de fluorescencia de un film polimérico dopado con moléculas fluorescentes y depositado sobre la muestra a estudiar. Con este método se estudió y comparó el

Resumen

desempeño de nanoantenas plasmónicas metálicas y semiconductoras, arrojando como resultado que las semiconductoras alcanzan menores temperaturas que las metálicas. Esto demuestra que las nanoantenas semiconductoras podrían utilizarse en esquemas de sensado ultrasensible, como ser SERs, sin afectar la muestra por calentamiento.

Finalmente, se construyó y caracterizó una fuente de luz solitónica sintonizable por potencia, basada en una fibra óptica de cristal fotónico (PCF), que sirve como fuente de luz alternativa para el microscopio confocal. Se mostró que el ancho de pulso de los solitones se mantiene constante para todo el rango de sintonizabilidad (860-1200 nm) en un valor de 45 fs. También se muestra la robustez de esta fuente de luz ante variaciones del chirp del pulso de entrada. Las particulares características de esta fuente de luz, principalmente su amplia y rápida sintonizabilidad, abre diversas alternativas para el estudio de propiedades físico-químicas de materiales así como propiedades bioquímicas en sistemas biológicos.

Palabras clave: Microscopías ópticas de fluorescencia. Microscopía de Fuerza Atómica. Meccanotransducción celular. Nano-antenas. Solitones en fibras ópticas de cristal fotónico.

Design and application of advanced microscopies for problems in cellular mechanotransduction and nanoplasmonics

Abstract

The study of problems that require both spatial resolution and chemical specificity demands the development of specific and adaptable tools for the relevant variables of each problem. In this thesis we have studied two problems from different fields such as biophysics and nanophotonics, using the same platform of advanced microscopy.

In the biophysics field, we studied the dynamics of formation and remodeling of Focal Adhesions (FA). FAs are multiprotein complex the cell creates to anchor to the extra cellular matrix. This adhesion process is a highly dynamic force-dependent process that evolves at several temporal scales. An understanding of this process requires precise measurements of forces and its correlation with the biochemical responses in living cells. We present a method that allows to access quantitatively information about live cell responses when a controlled, local and specific mechanical stimulus is applied to live cells. This approach combines atomic force microscopy (AFM) with fluorescence imaging. Using this combined technique, we studied the recruitment of adhesion proteins such as vinculin, FAK and zyxin triggered by applying forces in the nN regime. We observed the development of a nascent adhesion site, which was evident from the accumulation of vinculin at the position where the force was applied. In addition, we quantified the recruitment time for FAK in the formation of a new adhesion site, and analyzed the zyxin spatial distribution remodeling in mature focal adhesion as a function of the applied force. We have demonstrated that this method is a useful tool for the study of a variety of complex biological processes involved in cellular mechanotransduction.

In nanophotonics and particularly in nanoplasmonics field, we studied metallic nanoantennas, which have recently been widely used to enhance and confine light in nanometric volumes. Nanoantennas have been proved to be useful in a variety of applications that range from molecular sensing to high resolution microscopies. The local field enhancement is due to so called plasmonic resonances, produced by the collective oscillation of the conducting electrons in metals. However, there is a fundamental problem with this scheme: metallic structures suffer from ohmic losses, leading heating of the structure and its local environment. The multipropose platform developed in this thesis includes a dual beam confocal microscope, which allows the use of one laser to control the heat generation independently from the fluorescence excitation. This configuration was used in two related

Abstract

nanoplasmonic problems: A) the development and proof of principles of a new molecular sensing scheme, based in the plasmonic heating of gold nanorods and its consequent decrease in the fluorescence intensity. B) The development of a method of thermal mapping based in the decrease of fluorescence intensity with increasing temperature, using a polymeric thin film with fluorophores embedded deposited on the samples. We compared the temperature increase in gold and silicon nanoantennas when they are illuminated by a near infrared laser and we show lower temperature increase in the semiconductor structures. This fact demonstrates that semiconductor nanoantennas, unlike the metallic, can be used in ultra-sensitive schemes such as SERS without heating the sample.

In addition, we built and characterized a high-speed wavelength tunable photonic crystal fiber-based source, capable of generating tunable femtosecond solitons in the infrared region. This unique light source can be used as an alternative excitation source for the confocal configuration. Through measurements and numerical simulation, we show that both the pulsedwidth and the spectral width of the output pulses remain nearly constant over the entire tuning range (860 to 1200 nm). We also show that this source is insensitive to chip variations in the pump pulse, even in the case of heavily chirped pulses. All these remarkable properties open up diverse alternatives to study physical and chemical properties of materials as well as biochemical properties in biological systems.

Key words: Optical fluorescence Microscopy. Atomic Force Microscopy. Cellular mechano-transduction. Nanoantennas. Solitons in photonic crystal fibers.

Índice general

1. Introducción general y motivaciones	1
2. Microscopio combinado de fuerza atómica y óptico	5
2.1. Introducción y motivaciones	6
2.2. Microscopía de fuerza atómica: principios de funcionamiento	7
2.3. Modos de operación para el microscopio de fuerza atómica	8
2.3.1. Modo contacto	8
2.3.2. Modo intermitente	9
2.3.3. Espectroscopía de fuerza	10
2.4. Sondas para el microscopio de fuerza atómica	10
2.5. El fenómeno de fluorescencia	12
2.5.1. Sondas fluorescentes	14
2.5.2. Proteínas fluorescentes visibles	15
2.6. Microscopía de fluorescencia	16
2.7. Diseño, construcción y caracterización del microscopio combinado	17
2.7.1. Microscopio de fuerza atómica LEC	17
2.7.2. Microscopio de fluorescencia <i>Wide field</i>	23
2.7.3. Microscopio combinado	26
2.8. Combinación de topografía y fluorescencia para estudiar células vivas	29
2.9. Conclusiones	29
3. Aplicaciones a la biofísica: mecanotransducción celular	31
3.1. Introducción y motivaciones	32
3.2. Detección de fuerzas de interacción para moléculas únicas	33
3.3. Visualización de adhesiones focales en células vivas	35
3.4. Estudio de la respuesta bioquímica a un estímulo mecánico local	36
3.4.1. Descripción del experimento	36
3.4.2. Reclutamiento de vinculina y formación de una adhesión focal	39
3.4.3. Estudio de la quinasa de adhesión focal (FAK)	40
3.4.4. Remodelado de la distribución espacial de la proteína zixina para distintas fuerzas	41
3.5. Conclusiones	43
4. Microscopía confocal de doble haz	45
4.1. Introducción y motivaciones	46
4.2. Principios de funcionamiento de la microscopía confocal	47
4.3. Descripción del microscopio confocal de doble haz	49
4.3.1. Iluminación confocal y fuentes de luz	49
4.3.2. Superposición de los haces	51

Índice general

4.3.3. Detección confocal	52
4.3.4. Módulo de detección espectral	52
4.4. Caracterización del microscopio de doble haz	53
4.4.1. PSF de <i>scattering</i>	53
4.4.2. PSF de fluorescencia	54
4.5. Galería de imágenes confocales	55
4.6. Conclusiones	56
5. Aplicaciones a la nanoplasmónica	59
5.1. Biosensado molecular utilizando nanopartículas metálicas	60
5.1.1. Introducción y motivaciones	60
5.1.2. Descripción e implementación del ensayo	60
5.1.3. Disminución selectiva de la fluorescencia	62
5.1.4. Sistema modelo: detección de estreptavidina en un ensayo tipo “sándwich”	63
5.1.5. Conclusiones	64
5.2. Nanoantenas intensificadoras no-plasmónicas	65
5.2.1. Introducción y motivaciones	65
5.2.2. Diseño de las Nanoantenas	67
5.2.3. Rendimiento de las nanoantenas dieléctricas: SERS	69
5.2.4. Método de mapeo térmico	72
5.2.5. Calentamiento ultra-bajo de las antenas no plasmónicas	76
5.2.6. Intensificación de fluorescencia por superficie	79
5.2.7. Conclusiones	81
6. Microscopías no lineales: nuevas fuentes de luz	83
6.1. Introducción y motivaciones	84
6.1.1. Microscopías no lineales	85
6.1.2. Fuentes de luz alternativas para microscopías no lineales: PCFs	86
6.2. Desarrollo de una nueva fuente de luz rápidamente sintonizable para microscopías no lineales	88
6.2.1. Propagación de pulsos en fibras ópticas: Ecuación no lineal de Schrödinger (NLSE)	92
6.2.2. Simulaciones numéricas	94
6.2.3. Dispositivo experimental para la fuente de luz sintonizable	94
6.2.4. Caracterización de la fuente de luz solitónica	96
6.2.5. Aplicación de la fuente de luz	99
6.2.6. Conclusiones	100
6.3. Microscopía de segunda armónica: estudio de estructuras híbridas	100
6.3.1. Nanohilos de ZnO	101
6.3.2. Nanoantenas intensificadoras	102
6.3.3. Modificación del microscopio para detectar SH	103
6.3.4. Intensificación de segunda armónica	104
6.3.5. Conclusiones	106
7. Conclusiones y perspectivas	107
A. Detectores	109
A.1. Cámara CCD	109
A.2. Fotodiodo de Avalanche (APD)	109

Índice general

A.3. Fotomultiplicadores (PMT)	109
B. Detalles elementos ópticos	113
B.1. Microscopio combinado	113
B.2. Microscopio confocal	113
C. Medición de la PSF con distintas sondas	115
Bibliografía	118
Agradecimientos	133

Índice general

Índice de figuras

2.1. Esquema del principio de funcionamiento del AFM	8
2.2. Modos de funcionamiento del AFM	9
2.3. Espectroscopía de fuerza	11
2.4. Imágenes SEM de sondas de AFM	12
2.5. Diagrama de Jablonski con los fenómenos de fluorescencia y fosforescencia . .	14
2.6. Sondas fluorescentes utilizadas en este trabajo	15
2.7. Esquema básico para la microscopía de fluorescencia	16
2.8. Esquema conceptual de la microscopía de <i>wide field</i>	18
2.9. Representación esquemática del AFM construido en el LEC	19
2.10. Detalle del cabezal de AFM construido en el LEC	20
2.11. Imágenes de topografía e histogramas de altura de una grilla de calibración .	22
2.12. Esquema del microscopio óptico <i>wide field</i>	24
2.13. Caracterización del microscopio <i>wide field</i>	26
2.14. Imagen de fluorescencia células fijadas	27
2.15. Microscopio combinado AFM-óptico	27
2.16. Imagen de transmisión con el sensor de fuerza	28
2.17. Caracterización del ruido en la CCD en el modo combinado	29
2.18. Imagen combinada AFM-fluorescencia de células vivas	30
3.1. Experimento de interacción de moléculas únicas: Bio-StA	34
3.2. Imágenes de fluorescencia de proteínas de adhesión en células vivas	35
3.3. Preparación del sensor de fuerza: limado y funcionalización	37
3.4. Esquema experimental del ensayo para el estudio mecanotransducción	38
3.5. Evolución temporal para la vinculina	39
3.6. Observación de la formación de una FA naciente con vinculina	40
3.7. Reclutamiento de FAK: observación del tiempo característico	41
3.8. Remodelado espacial de zixina	42
4.1. Esquema del principio confocal	48
4.2. Dispositivo experimental del microscopio confocal <i>home-made</i>	50
4.3. PSF de <i>scattering</i>	54
4.4. PSF de fluorescencia	55
4.5. Imagen confocal de células fijadas	56
4.6. Imagen confocal de <i>scattering</i> de nanoestructuras de silicio	57
5.1. Esquema ilustrativo del principio de funcionamiento del ensayo	61
5.2. Implementación experimental del ensayo	62
5.3. Disminución de fluorescencia fototérmica	63
5.4. Ensayo tipo sándwich para determinar la concentraciones de un analito . .	64

Índice de figuras

5.5. Caracterización teórica de las nanoantenas de silicio	68
5.6. Imágenes SEM de las nanoantenas fabricadas	69
5.7. Esquema experimental para SERS	70
5.8. Intensidad Raman e intensificación SERS	71
5.9. Esquema de funcionamiento del mapeo térmico	72
5.10. Intensidad de fluorescencia del NR para distintas temperaturas	73
5.11. Imágenes de fluorescencia para el mapeo térmico	75
5.12. Medidas de temperatura media en las nanoantenas	77
5.13. Temperatura de las nanoantenas en el gap	78
5.14. Temperatura de las nanoantenas en el <i>gap</i> a distintas λ_h	78
5.15. Propiedades de emisión en el <i>gap</i> de las nanoantenas	80
5.16. Mapa de SEF de moléculas de NR embebidas en un film de PMMA sobre nanoantenas de Silicio	81
 6.1. Diagramas de Jablonski de los efectos no lineales utilizados en microscopía .	85
6.2. Dispersión de la fibra utilizada para la fuente de luz	90
6.3. Ilustración del fenómeno de automodulación de fase	91
6.4. Esquema del dispositivo experimental para la fuente de luz solitónica	95
6.5. Espectros de salida de la PCF para distintas potencias acopladas	97
6.6. Evolución del espectro de los pulsos a lo largo de la fibra óptica	98
6.7. Comportamiento de la rama con pulsos de bombeo limitados por transformada	98
6.8. Comportamiento de la rama solitónica infrarroja frente al <i>chirp</i> del bombeo	99
6.9. Ancho temporal de la rama solitónica con $C = 7400 \text{ fs}^2$	100
6.10. Imagen SEM de los nanohilos de ZnO	101
6.11. Propiedades ópticas de los nanohilos de ZnO	102
6.12. Nanoantenas intensificadoras con forma de pentámero	103
6.13. Segunda armónica generada por las nanoestructuras aisladas	104
6.14. Intensificación de segunda armónica en nanoestructuras híbridas	105
 A.1. Eficiencia cuántica de la cámara en función de la longitud de onda	110
A.2. Eficiencia cuántica para el APD en función de la longitud de onda	110
A.3. Eficiencia cuántica para los PMTs en función de la longitud de onda	111
 B.1. Espectros de los elementos del microscopio <i>wide field</i>	114
B.2. Espectros de los elementos del microscopio confocal	114
 C.1. Resultados de las simulaciones	116

Capítulo 1

Introducción general y motivaciones

Los orígenes de la microscopía se remontan al siglo XVII. Podemos atribuirle a Galileo Galilei haber dado el puntapié inicial con la construcción del primer microscopio compuesto en 1624. Años después Van Leeuwenhoek, quien se considera el padre de la microbiología, logró observar por primera vez microorganismos utilizando lentes que él mismo había pulido, con notable habilidad. El primer reporte científico del uso de microscopios fue el famoso trabajo de Robert Hooke, *Micrographia*, donde presenta el diseño de un microscopio compuesto y los estudios de diversos elementos reportados con exquisitos dibujos a mano, por ejemplo, una pulga, el ojo de una mosca, la estructura porosa del corcho, lana teñida, diversas semillas y plantas [Hooke, 1664]. De hecho, Hooke fue quien acuñó el término célula (*cell*) aunque no lo utilizó con el significado actual.

Luego, a fines del siglo XIX, Ernst Abbe formalizó el estudio de la formación de imágenes en sistemas ópticos y formuló lo que se conoce como el límite de difracción, que impone una barrera a la resolución alcanzable con un microscopio convencional:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin(\alpha)}, \quad (1.1)$$

donde d es la distancia mínima de separación entre dos puntos que pueden ser resueltos, λ es la longitud de onda de la luz utilizada y $n \sin \alpha$ se conoce como la apertura numérica (NA) del sistema de lentes utilizado [Abbe, 1873]¹. Este límite para el caso de microscopías ópticas convencionales se encuentra en ~ 200 nm. Durante mucho tiempo se consideró imposible de sobrepasar este límite y las estrategia para mejorar la resolución en microscopía fue disminuir la longitud de onda. Por ejemplo, un cambio significativo se obtiene si en lugar de utilizar luz se utilizan directamente electrones para reconstruir imágenes, que es la idea del microscopio electrónico de transmisión (*Transmission Electron Microscope*, TEM) [Knoll y Ruska, 1932] y del microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscope*, SEM) [von Ardenne, 1940], que se empezó a comercializar recién en 1965.

Durante el siglo XX la comunidad científica invirtió considerables esfuerzos en mejorar las técnicas de microscopía óptica, implementando nuevas técnicas de generación de contraste, como la utilización de fluorescencia [Heimstädt, 1911; Ellinger y Hirt, 1929], contraste de fase [Zernike, 1935, 1942], interferencia [Smith, 1955] o polarización [Schmidt,

¹A pesar que en el trabajo original de Abbe esta fórmula no aparece, se le atribuye a él esta manera de expresar el límite de difracción.

Capítulo 1. Introducción general y motivaciones

1939]. Otro hito importante en la microscopía óptica fue la invención de la detección confocal, que consiste en utilizar dos *pinholes*, uno para excitar la muestra en un único punto y otro para rechazar la luz que no viene del plano focal [Minsky, 1961].

Cabe destacar que la utilización de fluorescencia como mecanismo de contraste para realizar imágenes es un hito de gran importancia en la microscopía óptica pues le agrega la importante propiedad de ser químicamente específica; la llamada inmunofluorescencia permite la unión específica de las sondas fluorescentes a una especie química particular dentro de la muestra utilizando anticuerpos [Coons *et al.*, 1941]. Más aún, el descubrimiento [Shimomura *et al.*, 1962] y posterior síntesis [Chalfie *et al.*, 1994; Tsien, 1998] de las proteínas visibles fluorescentes (*Visible Fluorescent Proteins*, VFP) permitió el etiquetado *in vivo* de proteínas dentro de las células, lo que cambió la naturaleza y el enfoque de las preguntas que pueden responderse en el área de biología celular. En cuanto a la resolución, los más recientes avances en el área de la microscopía óptica han logrado vencer por mucho el límite de Abbe utilizando las llamadas microscopías de superresolución, que le valieron el Premio Nobel de Química 2014 a sus inventores (Stefan Hell y Eric Betzig). En estas técnicas se utilizan distintos mecanismos para controlar el estado molecular de las sondas fluorescentes de manera de poder asegurar que la emisión proviene de una zona específica de la muestra y así mejorar la resolución.

A partir de esto se implementaron técnicas que permiten estudiar procesos dinámicos moleculares, como la espectroscopía de correlación de fluorescencia (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*, FCS) [Magde *et al.*, 1972; Schwille *et al.*, 1999] o la recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*, FRAP) [Axelrod *et al.*, 1976], o bien la interacción molecular, a través del estudio de la trasferencia de energía resonante de Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) [Jares-Erijman y Jovin, 2003; Goldman *et al.*, 2010; Cap.6].

Otra alternativa para de vencer la barrera de Abbe fue propuesta conceptualmente en 1928 por Synge [Synge, 1928]. Se trata de utilizar una abertura mucho más chica que la longitud de onda para tener una excitación localizada y así mejorar la resolución, barriendo la abertura a escasos nanómetros de la muestra. Esta es la idea básica detrás de lo que hoy se conoce como microscopio óptico de campo cercano (SNOM), que fue presentado a mediados de la década de 1980 [Pohl *et al.*, 1984]. En este tipo de microscopios se detectan las ondas no propagantes del campo cercano, lo que permite reconstruir imágenes ópticas con mayor resolución que la impuesta por la ecuación 1.1. Años más tarde, en lugar de utilizar aberturas se comenzaron a utilizar puntas sin abertura, excitadas en sus resonancias de plasmones [Fischer y Pohl, 1989; Fischer, 1990; Inouye y Kawata, 1994; Bragas *et al.*, 1998; Bragas y Martínez, 2000] para conseguir una iluminación o colección localizada y además intensificada. Estas microscopías por intensificación de campo dieron lugar a un conjunto de propuestas de fabricación y testeо basadas en nanoestructuras metálicas, que finalmente dieron lugar al nacimiento de lo que hoy se conoce como la nanoplasmónica.

La nanoplasmónica propone controlar la luz en escalas nanométricas utilizando nanoestructuras metálicas diseñadas específicamente para dar lugar a campos electromagnéticos ultra confinados y altamente intensificados en volúmenes nanométricos, llamados *hot spots*. Dispositivos con esta notable propiedad de confinar la luz y hacer de puente entre el campo cercano y el campo lejano se conocen hoy como antenas ópticas o nanoantenas [Bharadwaj *et al.*, 2009; Novotny y van Hulst, 2011]. El origen físico de este fenómeno se encuentra en las llamadas resonancias plasmónicas localizadas, que son oscilaciones colectivas de los electrones de conducción en los metales [Maier, 2007].

Este tipo de dispositivos nanofotónicos ha tenido mucho impacto en diversas aplicaciones, como la mejora en la eficiencia de la fotodetección [Tang *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2010], la emisión de luz en la nanoescala [Cubukcu *et al.*, 2006], biosensado con sensibilidad de molécula única [Anker *et al.*, 2008], generación de calor en la nanoescala [Schuller *et al.*, 2009] o espectroscopía [Novotny y Stranick, 2006; Jäckel *et al.*, 2007]. También se ha utilizado para dirigir la emisión [Taminiau *et al.*, 2008] o detectar moléculas individuales [Mivelle *et al.*, 2014b], o bien para generación de armónicos superiores [Bouhelier *et al.*, 2003; Lippitz *et al.*, 2005; Grinblat *et al.*, 2014; Aouani *et al.*, 2014].

El microscopio óptico de campo cercano es un ejemplo de las llamadas microscopías de barrido por sonda (*Scanning Probe Microscopy*, SPM), que comparten la idea conceptual de barrer una sonda afilada sobre la muestra, de manera que alguna interacción física genere contraste y permita reconstruir una imagen. Dos ejemplos importantes de este tipo de microscopía son el Microscopio de Efecto Túnel (*Scanning Tunneling Microscope*, STM) [Binnig *et al.*, 1982], donde se utiliza la corriente que generan los electrones que pasan a través de una barrera de potencial que se coloca entre la punta y la muestra para sentir la distancia punta-muestra y el Microscopio de Fuerza Atómica (*Atomic Force Microscope*, AFM) Binnig *et al.* [1986], donde la interacción utilizada es la fuerza entre los átomos de la muestra y de la punta. Tanto las microscopías ópticas como las de barrido por sonda han probado ser muy útiles para el estudio de distintos problemas en el área de las ciencias biofísicas y la nanotecnología. En particular, el AFM, gracias a su capacidad de trabajar en ambiente fisiológico y la posibilidad de medir fuerzas en el rango de los pN y nN resulta especialmente adecuado para el estudio de superficies biológicas [Radmacher, 1997; Rotsch *et al.*, 1997; Pietrasanta *et al.*, 1999; Müller y Dufrene, 2008] y de fuerzas de interacción entre moléculas individuales [Rief *et al.*, 1997a; Ludwig *et al.*, 1999; Viani *et al.*, 1999, 2000; Oberhauser *et al.*, 2002].

En este trabajo se presenta una plataforma de microscopía combinada *home-made*, que busca combinar de manera eficiente y versátil la microscopía de fuerza atómica con la microscopía de fluorescencia. La motivación para la construcción de este equipo viene del área de la biofísica, en particular, de la mecanotransducción celular, que es el estudio de los procesos por el cual las células detectan las fuerzas mecánicas y las convierten en respuestas bioquímicas. Este es un complejo proceso que cuenta con múltiples participantes entre los que se destacan la matriz extracelular (*Extra Celular Matrix*, ECM) y los receptores de adhesión, que son proteínas integrales de membrana (llamadas integrinas) [Vogel, 2006; Vogel y Sheetz, 2006].

Con el objetivo de estudiar este problema, se presenta un esquema de trabajo específico para esta plataforma combinada, donde se explota la posibilidad de ejercer fuerzas mecánicas que posee el AFM y la posibilidad de estudiar dinámica de proteínas que brinda la microscopía óptica de fluorescencia. En particular, se estudia la evolución temporal de proteínas presentes en las Adhesiones Focales (FA) en respuesta a un estímulo mecánico específico, local y controlado. Este estudio en el área de mecanotransducción se realizó en estrecha colaboración con el grupo del Centro de Microscopías Avanzadas, FCEyN, UBA, liderado Prof. Lía Pietrasanta.

Sumado a esto, el equipo construido tiene un microscopio confocal de doble haz, que permite excitar simultáneamente con dos láseres (uno visible y otro infrarrojo) y detectar *scattering* o fluorescencia de una muestra. La motivación para este instrumento viene desde el área de la nanofotónica, que enmarca las aplicaciones realizadas con esta configuración. La primera consiste en el estudio de unas novedosas nanoantenas de silicio que, a diferencia

Capítulo 1. Introducción general y motivaciones

de las estructuras metálicas, presentan un calentamiento ultra-bajo cuando se las ilumina en resonancia. Esta aplicación fue desarrollada en conjunto con el laboratorio del Prof. Stefan Maier (*Imperial College*, Londres, Inglaterra). La segunda aplicación consiste en el desarrollo de un esquema de biosensado basado en el calentamiento plasmónico de nanobarras de oro, que fue realizada en conjunto con el grupo Nanofísica Aplicada, liderado por el Prof. Ferando Stefani (CIBION, Buenos Aires, Argentina).

Finalmente, se desarrolló y caracterizó en detalle una fuente de luz solitónica infrarroja, ampliamente sintonizable basada en una fibra óptica de cristal fotónico (*Photonic Crystal Fibre*, PCF). Esta fuente de luz permite sintonizar pulsos ultracortos en un amplio rango del infrarrojo cercano (NIR), manteniendo su potencia y ancho de pulso constante. Notablemente este comportamiento no se ve afectado por la dispersión presente en los pulsos de bombeo. Esta fuente de luz alternativa puede ser utilizada en el microscopio confocal, abriendo nuevas posibilidades a las microscopías no lineales. También se utiliza el microscopio confocal para el estudio de la generación eficiente de segunda armónica óptica en la nanoescala, en particular, en sistemas híbridos nanoantena plasmónica-nanohilo semiconductor.

Esta tesis se organiza de la siguiente manera. El capítulo 2 presenta el diseño y el estudio detallado del desempeño del microscopio de fuerza atómica combinado con el de fluorescencia *wide field*. Se presentan los distintos modos de trabajo y ejemplos de la combinación de las dos técnicas. En el capítulo 3 se presenta el estudio detallado sobre mecanotransducción, que utiliza el microscopio combinado para estudiar la respuesta de proteínas de adhesión ante un estímulo mecánico controlado, local y específico. El capítulo 4 expone el diseño del microscopio confocal de doble haz, sus modos de excitación y detección y la caracterización de cada uno. Las mencionadas aplicaciones a la nanoplasmónica para las que fue utilizado el microscopio de doble haz construido se presentan en detalle en el capítulo 5. Finalmente, el desarrollo y la caracterización de la fuente de luz solitónica se discuten en el capítulo 6, junto con el estudio de la segunda armónica de nanohilos de ZnO. Por último, se presentan las conclusiones en el capítulo 7.

Capítulo 2

Microscopio combinado de fuerza atómica y óptico

En este capítulo se presenta el diseño y la caracterización del microscopio combinado de fuerza atómica-óptico que fue adaptado según las necesidades de las aplicaciones a lo largo de esta tesis doctoral. Se presentan los principios de funcionamiento de los microscopios de fuerza atómica y ópticos de fluorescencia y se detalla cómo fueron combinadas las dos técnicas en una misma plataforma.

2.1. Introducción y motivaciones

La microscopía de barrido por sonda *Scanning Probe Microscope*, (SPM) es una técnica que provee información espacial tridimensional y localizada de una muestra de interés a través del barrido de una sonda en las vecindades de la superficie de la muestra. Al hacer esto, se adquieren las señales de interacción sonda-muestra que, dependiendo de la sonda que se utilice, revelarán información específica de la muestra, además de su topografía. Dentro de esta técnica se encuentran el **Microscopio de Fuerza Atómica** (*Atomic Force Microscope*, AFM), el Microscopio de Efecto Túnel (*Scanning Tunneling Microscope*, STM) y el Microscopio Óptico de Campo Cercano (*Near Field Scanning Optical Microscope*, NSOM), entre otros.

El AFM fue presentado por primera vez en el trabajo pionero de Binnig *et al.* [1986] y, a diferencia de su inmediato predecesor, el STM [Binnig *et al.*, 1982], no necesita que la muestra sea conductora, hecho que abrió las puertas al estudio de todo tipo de materiales, incluyendo muestras biológicas en escalas nanométricas. Este microscopio, no solo permite la obtención de imágenes tridimensionales de la topografía de la muestra con una resolución (sub)nanométrica, sino también la posibilidad de medir fuerzas en el rango de los piconewttons (pN) [Engel y Müller, 2000], con la ventaja adicional de necesitar una mínima preparación de la muestra. Esto llevó a una gran diversificación de aplicaciones en bionanociencias, incluyendo el estudio de entidades subcelulares [Pietrasanta *et al.*, 1994], propiedades elásticas de polímeros [Magonov y Reneker, 1997], manipulación [Custance *et al.*, 2009] y reconocimiento químico de átomos individuales [Sugimoto *et al.*, 2007], entre otras.

Sumado a esto, la razón por la que este tipo de microscopios ha revolucionado el área de las bionanociencias es que, mediante una mínima adaptación, pueden funcionar en condiciones fisiológicas (bajo líquido, a 37°C), lo que conlleva la posibilidad de estudiar células vivas e interacciones biomoleculares **en vivo** [Müller y Dufrene, 2008]. Este hecho fundamental permitió el estudio de la topografía de células individuales vivas [Radmacher, 1997], sus propiedades elásticas [Radmacher, 2002; Sirghi *et al.*, 2008; Gavara y Chadwick, 2012] y de adhesión [Sirghi *et al.*, 2008; Helenius *et al.*, 2008] así como también el estudio de moléculas individuales, que proporciona información sobre las bases moleculares de procesos biológicos tales como el reconocimiento molecular [Hinterdorfer y Dufrêne, 2006], el plegado y desplegado de proteínas [Rief *et al.*, 1997b] como las propiedades mecánicas del ADN [Rivetti *et al.*, 1998].

Por otra parte, la **Microscopía Óptica de Fluorescencia** y todas sus técnicas asociadas se han convertido en una caja de herramientas indispensable para el estudio de diversos problemas en la escala micro y nanométrica, con especial énfasis en el área de las ciencias biológicas, debido a la posibilidad de trabajar en condiciones fisiológicas, su baja invasividad y su alta especificidad molecular.

La combinación de estas microscopías permite el abordaje simultáneo en distintas escalas de las propiedades físicas, físico-químicas, biofísicas y bioquímicas del material en estudio; se combinan la escala nanométrica y la posibilidad de medir y aplicar fuerzas mecánicas con la alta especificidad química y la resolución temporal de la microscopía de fluorescencia. Debido a que ambas microscopías pueden ser implementadas en condiciones fisiológicas de manera sencilla, experimentos simultáneos en sistemas *in vivo* prometen descubrir nuevos horizontes en el entendimiento de la interrelación entre una fuerza mecánica aplicada y sus respuestas celulares.

2.2. Microscopía de fuerza atómica: principios de funcionamiento

El principio de funcionamiento del AFM consiste en hacer interactuar una punta extremadamente afilada, con menos de 20 nm de radio y unos micrones de alto, con la muestra a estudiar. Esta punta interactúa con la muestra debido a las fuerzas atómicas que experimentan sus átomos debido a la presencia de la muestra, lo que da nombre a esta técnica. Luego, para obtener información sobre la muestra se barre (o escanea) la punta a lo largo de la muestra mientras se graban las señales de interés para la magnitud física a estudiar.

El elemento clave introducido por Binnig *et al.* [1986] es un fleje o *cantilever*, que sostiene a la punta que interactúa con la muestra y funciona como un resorte cuya masa es tan pequeña que su mínimo desplazamiento detectable corresponde a una fuerza comparable con la fuerza entre átomos. Para lograr esto, hay diversos diseños comerciales que se mostrarán en la sección 2.4. El conjunto punta-*cantilever* suele denominarse sensor de fuerza.

En el mencionado trabajo pionero de 1986 se utilizó un STM para medir los desplazamientos del cantilever. Unos años después se introdujo el uso de un láser que se refleja en el *cantilever* para medir de manera precisa y sencilla los desplazamientos del mismo [Meyer y Amer, 1988], método muy utilizado en la actualidad y presentado esquemáticamente en la figura 2.1: se hace incidir un haz láser sobre la superficie del *cantilever* (se suelen metalizar para lograr una alta reflectividad) y el haz reflejado se envía a un detector de cuatro cuadrantes, que permite obtener la posición del *spot* en la dirección normal y lateral (ver figura 2.1). La primera se obtiene restando la suma de los dos cuadrantes superiores ($A + B$) con la suma de los dos inferiores ($C + D$) mientras que la posición lateral se obtiene restando la suma de los dos cuadrantes de la derecha ($B + D$) con la suma de los dos de la izquierda ($A + C$). De esta manera, el cambio en la posición vertical (lateral) del láser en el detector se deberá a un cambio en la deflexión normal (lateral) del *cantilever*, hecho que da acceso a las magnitudes deseadas sin necesidad de utilizar un STM.

El valor de la deflexión normal es proporcional a la fuerza que aplica la punta sobre la muestra según la ley de Hooke [Cappella y Dietler, 1999]:

$$F(\delta_c) = -k_c \delta_c, \quad (2.1)$$

donde F , δ_c y k_c representan la fuerza aplicada, la deflexión y la constante elástica del *cantilever*, respectivamente. Este comportamiento modela correctamente la fuerza siempre y cuando no se apliquen deflexiones extremadamente grandes, lo que llevaría a al pérdida del régimen lineal. Debido a esta relación se puede decir que medir la deflexión es equivalente a medir la fuerza, hecho que hace del AFM una excelente herramienta para el estudio de fuerzas en el rango pN-nN. En secciones siguientes se presentará un método que permite obtener experimentalmente la k_c .

Cabe notar que además de estos puntos mencionados, para la implementación de esta técnica es necesario un control subnanométrico de la distancia punta-muestra. Esto se logra moviendo alguno uno de los dos utilizando elementos piezoelectrinos, que alcanzan fácilmente la precisión necesaria. También se utiliza un lazo de control o *feedback loop* que corrige la distancia punta-muestra en tiempo real para evitar que la punta se estrelle contra la muestra y se destruya.

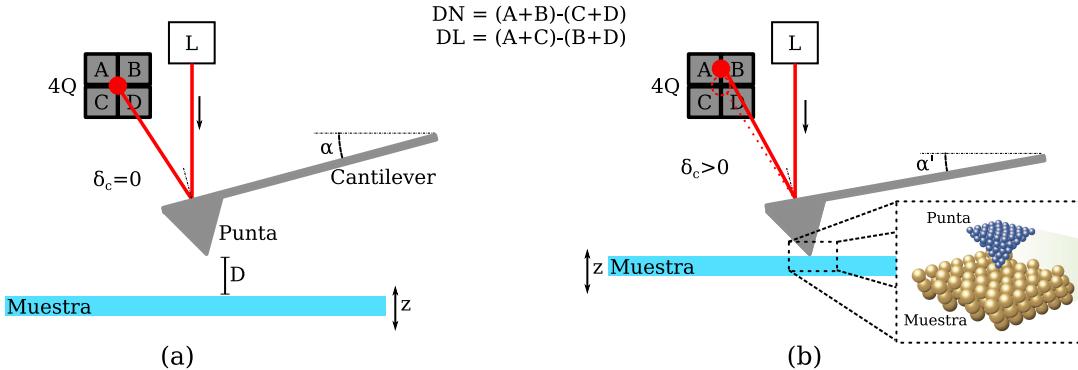


Figura 2.1: Esquema del principio de funcionamiento del AFM. (a) Situación inicial: la punta no interactúa con la muestra. El láser (L) es reflejado en el cantilever que se encuentra a un ángulo α respecto de la horizontal y con deflexión δ_c nula. En esta situación el *spot* láser cae en el centro del detector cuatro cuadrantes, dando lugar a una señal de deflexión normal (DN) y lateral (DL) nulas. (b) Punta interactuando con la muestra. Debido a la interacción con la muestra el cantilever se deflecta ($\delta_c > 0$) y el ángulo con la horizontal ahora es $\alpha' < \alpha$. Esto genera una señal de deflexión normal positiva ya que el *spot* ahora se desplazó hacia arriba en el detector. En el recuadro chico se muestra una representación de la interacción punta-muestra (extraído de [Bruker, 2011]).

2.3. Modos de operación para el microscopio de fuerza atómica

Existen diversos modos de operación y técnicas que se implementan con el AFM y permiten medir diversas propiedades de una muestra¹. A continuación se presentarán tres de las más utilizadas, que actualmente se consideran estándar y fueron implementadas en este trabajo: el modo contacto, modo intermitente y la espectroscopía de fuerza.

2.3.1. Modo contacto

En el llamado modo contacto, se selecciona un determinado valor de deflexión (que es proporcional a la fuerza según la ecuación 2.1) como referencia para el lazo de control y se acerca la punta a la muestra hasta que se obtiene el mencionado valor. En ese momento se dice que la punta está en contacto, ya que cuando estaba completamente retraída el valor de deflexión era nulo y debido a la interacción con la muestra se alcanzó el valor deseado.

Para obtener una imagen se barre la muestra en las direcciones laterales (x e y) con sendos piezoléctricos y el lazo de control cerrado, para que corrija la posición axial en tiempo real y así mantener la deflexión igual al valor de referencia durante el barrido. En la figura 2.2 (a) se esquematiza el proceso: cuando la topografía de la muestra alcance una elevación (depresión), la deflexión aumentará (disminuirá) hecho que será corregido por el

¹En el catálogo de sondas de la marca Bruker se mencionan más de una docena de modos de trabajo no presentados aquí [Bruker, 2011], que permiten estudiar distintas propiedades físicas y químicas de la muestra con sondas especializadas.

2.3. Modos de operación para el microscopio de fuerza atómica

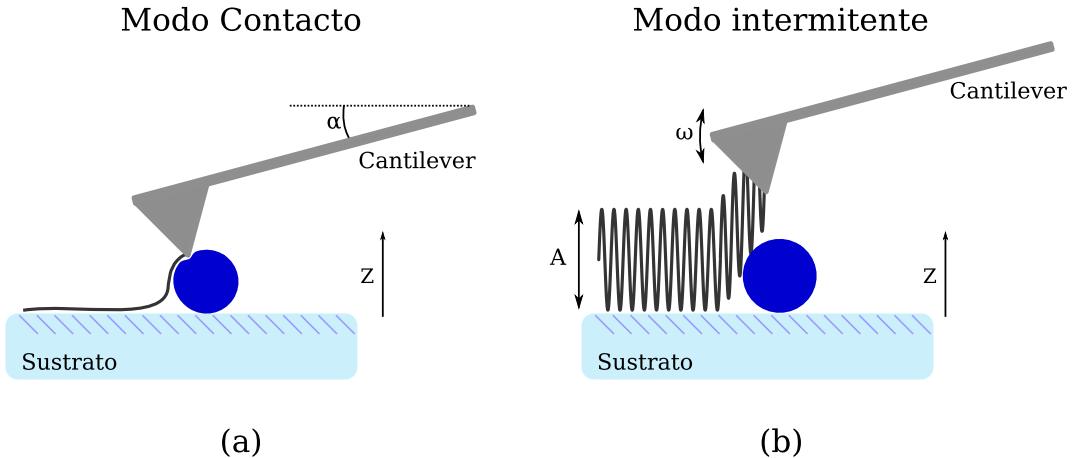


Figura 2.2: Modos de funcionamiento del AFM. (a) Esquema del modo contacto, donde la deflexión (α) se mantiene constante mientras se barre la muestra. La linea gris representa la trayectoria de la punta sobre la muestra. (b) Esquema del modo intermitente, donde la amplitud de oscilación A (frecuencia ω) del *cantilever* se mantiene constante durante el barrido.

lazo de control, disminuyendo (aumentando) la posición absoluta del piezoelectrónico axial (z).

Simultáneamente al barrido se adquieren la señal de posición absoluta (z), relacionada con la topografía de la muestra y la de deflexión o señal error, que no resulta totalmente constante porque el lazo de control tiene cierto tiempo de respuesta. Luego de hacer esto en cada punto de la muestra se obtienen una serie de datos: para cada (x, y) se tiene una imagen del valor de z , de deflexión y de cualquier otra señal que se adquiera, lo que brinda información tridimensional de la muestra.

2.3.2. Modo intermitente

El modo intermitente, también conocido como *tapping mode* (TM) consiste en hacer oscilar externamente a una determinada amplitud el *cantilever* en su frecuencia de resonancia (dependiendo del modelo de sensor varía desde decenas hasta las centenas de kHz) y se lo acerca a la muestra. Al estar suficientemente cerca como para interactuar con la muestra, la amplitud de oscilación disminuirá. Este modo se implementa principalmente en muestras blandas que pueden resultar dañadas en el modo contacto.

Para obtener una imagen se barre la muestra de manera análoga al modo contacto, también con el lazo de control activado, pero en este caso este mantiene un valor de amplitud constante, típicamente en un 90 % del valor de amplitud libre. En la figura 2.2 (b) se esquematiza el proceso: cuando la topografía de la muestra alcance una elevación (depresión), la amplitud de oscilación disminuirá (aumentará) y en consecuencia el lazo de control disminuirá (aumentará) la posición absoluta del piezoelectrónico axial (z). Para adquirir una imagen se barre la muestra lateralmente mientras se adquieren las señales de z y de amplitud de oscilación, que no resulta totalmente constante debido a que el lazo de control tiene cierto tiempo de respuesta. Para la implementación de este modo se

suele utilizar un amplificador *Lock-in*, que permite obtener la amplitud de oscilación a la frecuencia de resonancia con una excelente relación señal-ruido.

2.3.3. Espectroscopía de fuerza

Existe otra técnica de inmediata implementación relacionada con el AFM, es la llamada espectroscopía de fuerza, (*Force Spectroscopy*, FS), que consiste en realizar un ciclo de acercamiento-alejamiento entre la punta y la muestra, con el lazo de control desactivado, para luego graficar la deflexión del *cantilever* o la fuerza en función de la distancia punta-muestra. Esta técnica permite estudiar fuerzas de adhesión o de unión química como se explica a continuación.

En la figura 2.3 se esquematiza el procedimiento de esta técnica, donde se muestra una curva experimental y en el panel superior un esquema que representa las distintas situaciones que explican la peculiar apariencia de la curva. El ciclo comienza con la punta retraída, representado esquemáticamente en A, donde la punta no interactúa con la muestra y por lo tanto la deflexión es nula, lo que da lugar a la primer zona de la curva de acercamiento. Una vez que la punta entra en contacto con la muestra hay una zona lineal donde el desplazamiento del piezoelectrónico es igual a la deflexión (zona B en la curva y en el esquema). Al continuar aumentando la posición axial de la muestra se llega a una zona donde la deflexión satura (por encima de la línea verde en el gráfico, esquema C) y la relación uno a uno con el desplazamiento de la muestra deja de ser válida. Si se continuara acercando se podría dañar el *cantilever* permanentemente. Luego empieza el alejamiento, donde se tiene el mismo comportamiento mencionado hasta que se llega al punto donde se hizo contacto. Allí, debido a las fuerzas de adhesión entre la punta-muestra, la deflexión alcanza un valor negativo pues el *cantilever* se deflecta en la dirección contraria (representado en D). Al seguir disminuyendo z llega un momento que la fuerza que ejerce el *cantilever* vence las fuerzas de adhesión y la deflexión vuelve abruptamente al valor nulo. Este último salto en la curva constituye una medida del valor de las fuerzas de adhesión [Cappella y Dietler, 1999], que puede obtenerse cuantitativamente utilizando el valor k_c .

Cabe notar que para obtener la calibración de curva en la figura 2.3 se utilizó la zona lineal de la misma curva para transformar la señal eléctrica medida (salida del detector de cuatro cuadrantes) en valores de deflexión, ajustando una recta en la zona B de la curva y utilizando su pendiente para transformar al eje vertical. La pendiente de la mencionada curva se conoce como sensibilidad y se suele expresar en V/nm .

2.4. Sondas para el microscopio de fuerza atómica

Las sondas para AFM actualmente son comercializadas por distintas empresas, ofreciendo una amplia gama de diseños, pensados específicamente para distintas aplicaciones. Cada técnica a implementar necesita un tipo especial de sonda, ya sea por el material de fabricación, por sus características mecánicas o su rendimiento. Como ejemplo en www.brukerafmprobes.com se puede encontrar un extenso catálogo de sondas.

A la hora de seleccionar un sensor de fuerza para una aplicación concreta se suelen tener en cuenta las propiedades de la punta propiamente dicha y las del *cantilever*. En el caso de la punta, la propiedad más importante es el radio de curvatura, pues esto limita la

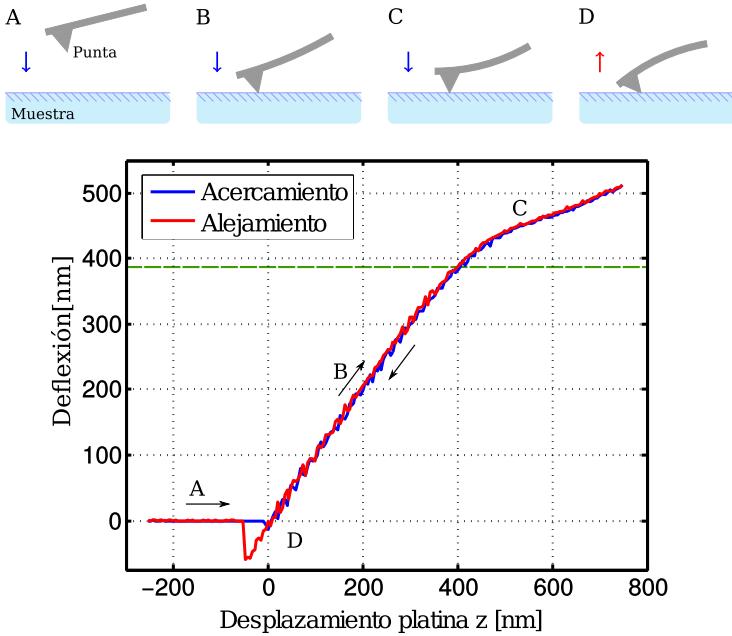


Figura 2.3: Espectroscopía de fuerza. En el panel de arriba se muestra un esquema de la situación en cada zona de la curva presentada abajo. Zona A: cuando la muestra no interactúa con la punta, la fuerza es nula (igual que la deflexión). Zona B: régimen lineal, donde el desplazamiento es igual a la deflexión (esta zona se utiliza para calibrar). Zona C: Se alcanza la saturación de la deflexión. Zona D: Al retraer la punta llega un momento en que las fuerzas de adhesión invierten el signo de la deflexión. Los esquemas fueron modificados a partir de los presentados en [Masip, 2011; Cap. 3].

resolución lateral de las imágenes a obtener: las puntas de radio menor permiten mayor resolución que las de mayor radio. En el caso del *cantilever* la característica más importante es la constante elástica, k_c , pues esta determina cuanta fuerza se aplica sobre la muestra y establece el rango de fuerzas que son medibles: dada la mínima deflexión detectable por encima del ruido la constante de proporcionalidad para traducir a fuerza es la k_c . Por lo tanto, constantes elásticas pequeñas permiten medir fuerza menores, alcanzando típicamente valores en el rango de los pN. Cabe mencionar que el valor de k_c está directamente relacionado con la forma y las dimensiones mecánicas del *cantilever* así como con la dureza del material que se utiliza.

Como se mencionó anteriormente, cada aplicación requiere ciertas características particulares para el sensor de fuerza. En el caso del modo contacto, ya sea en aire o en líquido, en este trabajo se utilizaron sensores de nitruro de silicio (Si_3N_4) con constantes elásticas bajas, que varían entre 0,02 y 0,5 N/m, con forma triangular y frecuencias de resonancia menores a 60 kHz. Cada sustrato puede contener distinta cantidad de *cantilevers* con idénticas puntas para tener la posibilidad de seleccionar distintos rangos de fuerza según la aplicación. En la figura 2.4 (a) se muestra una imagen de microscopio de barrido electrónico (SEM) de las sondas como ejemplo. En estos casos la punta puede variar según la aplicación; actualmente se comercializan puntas con radio nominal menor a 2 nm.

Para el caso de modo intermitente en aire se utilizaron sensores de silicio con constantes elásticas mucho más grandes que en el caso contacto, del orden de los 40 N/m y con

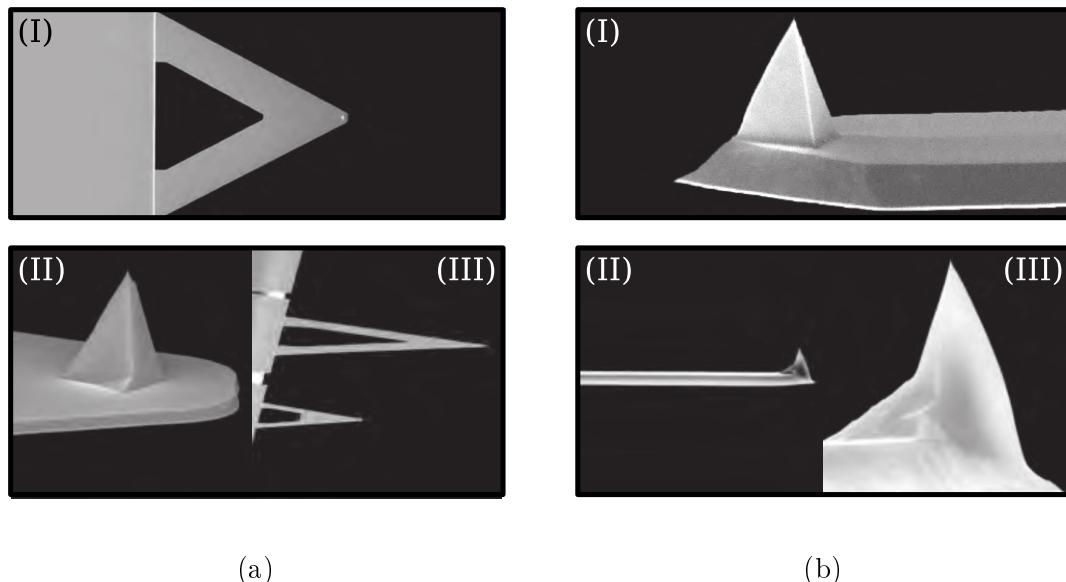


Figura 2.4: Imágenes SEM de sondas de AFM. (a) Sonda para modo contacto. En (I) se muestra una imagen tomada desde arriba donde puede apreciarse la forma en V del *cantilever* y parte del sustrato que sirve de sostén. (II) Detalle de la punta con forma de pirámide. (III) Imagen que muestra dos *cantilevers* de los cuatro presentes en el sustrato. (b) Sonda para modo intermitente. En (I) se muestra la punta un parte del *cantilever* rectangular y en (II) se muestra una imagen de perfil. (III) Detalle de la punta que tiene 8 nm de radio nominal. Extraído de [Bruker, 2011].

resonancias por encima de los 200 kHz. En la figura 2.4 (b) se muestran imágenes SEM de este tipo de sondas. Si se trabajara en el modo intermitente pero en medio líquido, se utilizan los mismos sensores que para el caso de contacto.

En la tabla 2.1 se detallan las características más importantes de los sensores utilizados en este trabajo para realizar imágenes de AFM en los modos contacto e intermitente.

2.5. El fenómeno de fluorescencia

Luminiscencia es la emisión de luz ultravioleta, visible o infrarroja de una sustancia electrónicamente excitada. Esta palabra se utiliza para describir todos los fenómenos de emisión de luz que no son debidos al cambio de temperatura de una sustancia, que se conoce como incandescencia. Los distintos tipos de luminiscencia se clasifican según el modo de excitación de la sustancia que emite luz, por ejemplo, sonoluminiscencia es la luminiscencia generada por sonido. Un caso particular de luminiscencia es la mencionada fotoluminiscencia, dentro de la cual se enmarcan los fenómenos de fluorescencia y fosforescencia [Valeur, 2001].

En estos fenómenos una sustancia absorbe fotones para pasar a un estado electrónico excitado que luego decae al estado fundamental emitiendo fotones. La naturaleza del estado excitado desde el cual los electrones decaen determina cuál de estos dos fenómenos ocurre, lo que los distingue conceptualmente: en el caso de fosforescencia, el estado excitado es un triplete mientras que en el de fluorescencia es un singlete. Esto marca una gran diferencia

Propiedad	Modo contacto	Modo Intermitente
Material	Nitruro de silicio	Silicio
Cantidad de sensores	4	1
Constante elástica k_c [N/m]	0,58; 0,12; 0,32; 0,06	42
Frecuencia de resonancia [kHz]	57; 20; 56; 18	320
Radio de curvatura de la punta [nm]	2	8
Longitud del <i>cantilever</i> [nm]	120; 205; 120; 205	125
Forma	V	Rectangular

Tabla 2.1: Propiedades de los sensores de fuerza de AFM. Se detallan las propiedades más relevantes de los sensores de fuerza utilizados en este trabajo para realizar imágenes de AFM. Los valores reportados aquí corresponden a los valores nominales que informa el fabricante [Bruker, 2011].

en las propiedades de emisión de estos dos fenómenos, por ejemplo en sus tiempos de vida, que están en la escala de los nanosegundos para el caso de fluorescencia y entre los milisegundos y los segundos en el caso de la fosforescencia [Lakowicz, 2007].

Los procesos de absorción y emisión de luz suelen ser representados en un diagrama de niveles energéticos conocido como el diagrama de Jablonski, donde los niveles energéticos estables de una molécula se esquematizan con líneas horizontales y las transiciones entre ellos se marcan con flechas verticales. Estas transiciones electrónicas ocurren en tiempos extremadamente cortos, del orden de los femtosegundos. En la figura 2.5 se muestra un ejemplo de este tipo de diagrama, donde se marcan los estados electrónicos singletes S_0 , S_1 y S_2 y un estado triplete, T_1 con sus respectivos estados vibracionales 0, 1, 2. Se representa también el proceso de absorción (marcado con violeta y azul) y de emisión de fluorescencia (marcado con verde claro) junto con el de fosforescencia (marcado con rojo). Sin embargo, no siempre que se alcanza un estado excitado se vuelve al estado fundamental emitiendo un fotón. Existen diversos mecanismos que pueden llevar a una molécula excitada a un estado de menor energía sin la emisión de un fotón, como la transferencia de energía resonante, el cambio de carga intra-molecular, cambios conformacionales, conversión interna o *intersystem crossing*, entre otros. De hecho, este último mecanismo es responsable del paso del estado singlete al triplete, que da lugar a la fosforescencia [Valeur, 2001].

El fenómeno de fluorescencia tiene ciertas características generales que se cumplen a excepción de casos pocos frecuentes. La primer característica a notar es el llamado corrimiento de Stokes, en honor a Sir. G. G. Stokes (1819-1903), quien observó por primera vez este fenómeno en 1852: la emisión de luz de la sustancia quinina (presente, por ejemplo, en el agua tónica actualmente) ocurría alrededor de 450 nm cuando se la iluminaba con luz ultravioleta (debajo de 400 nm). Es decir, la emisión de fluorescencia tiene menor energía que la excitación. Esto se debe a que al pasar al absorber energía las moléculas de quinina pasan al estado S_1 pero a algún estado vibracional distinto del 0. Este estado vibracional decae rápidamente sin emitir luz y luego ocurre la transición que emite un fotón, del estado S_1 a algún estado vibracional del estado S_0 o al mismo estado fundamental. Como consecuencia, la transición que emite un fotón es de menor energía que la de excitación, dando lugar a luz de mayor longitud de onda.

Otra propiedad que se repite en numerosos casos es que el espectro de fluorescencia es independiente de la longitud de onda de excitación, hecho que se debe a que el exceso de energía en la excitación llevará al sistema a un estado vibracional superior y este decaerá

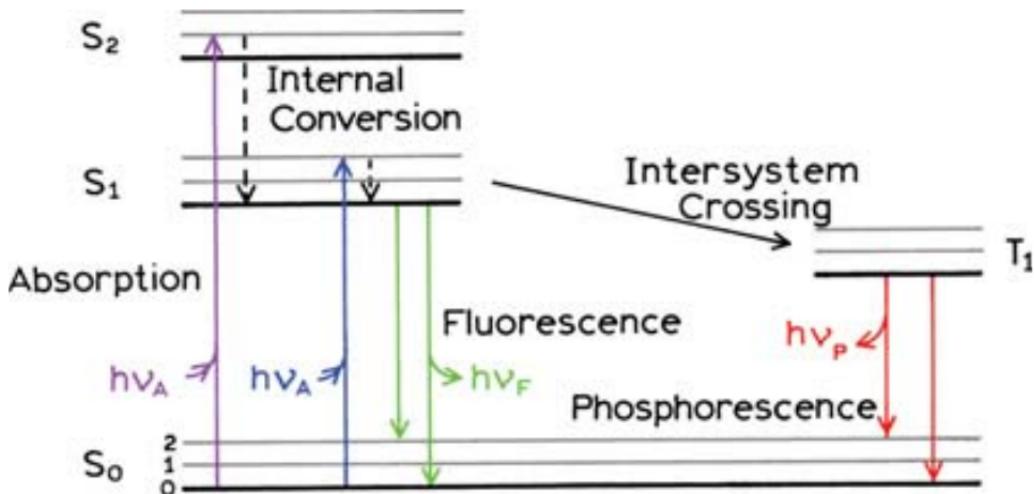


Figura 2.5: Diagrama de Jablonski con los fenómenos de fluorescencia y fosforescencia. Los estados estables se representan con líneas horizontales, los vibracionales tienen líneas finas. Las transiciones se representan con líneas verticales. Extraído de [Lakowicz, 2007].

rápidamente hasta el estado vibracional de menor energía \$S_1\$ (correspondiente al estado excitado en cuestión) y luego desde allí decaerá hasta \$S_0\$ emitiendo fluorescencia [Lakowicz, 2007].

2.5.1. Sondas fluorescentes

Las llamadas sondas fluorescentes son moléculas con alto rendimiento en la producción de fluorescencia. Existe una amplia gama de sondas fluorescentes, con diversas propiedades y técnicas de aplicación. *The Molecular Probes Handbook*² actualmente presenta más de 3000 sondas fluorescentes, que cubren ampliamente la zona óptica del espectro, desde el ultravioleta (UV) hasta el infrarrojo (IR).

Además del espectro de emisión y absorción existen otras propiedades que caracterizan el proceso de emisión de fluorescencia como el rendimiento cuántico o *quantum yield* (QY), el tiempo de vida (usualmente denominado \$\tau\$) y la fotoestabilidad. El rendimiento cuántico se define como la razón entre la cantidad de fotones emitidos y la cantidad de fotones absorbidos y se puede expresar como [Lakowicz, 2007]

$$QY = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \quad (2.2)$$

donde \$\Gamma\$ y \$k_{nr}\$ indican la tasa de emisión de fotones y la tasa de decaimientos no radiativos, respectivamente. Un excelente fluorósforo puede llegar a tener \$QY \sim 1\$.

El tiempo de vida de fluorescencia es el tiempo promedio que la sonda permanece en el estado excitado antes de volver al estado fundamental, es decir, el tiempo que hay desde

²Disponible en <http://www.lifetechnologies.com/ar/es/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>

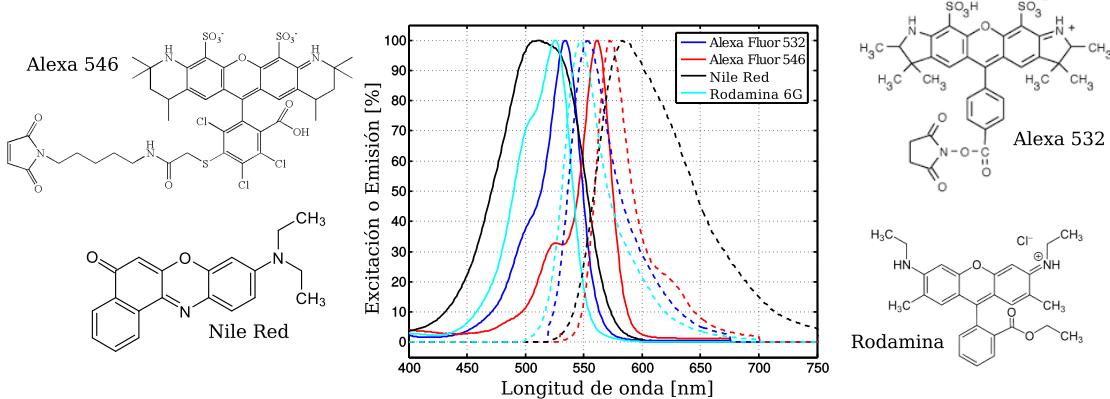


Figura 2.6: Sondas fluorescentes utilizadas en este trabajo. En línea llena se muestran los espectros de excitación y en línea punteada los de emisión, correspondientes a las 4 más utilizadas en este trabajo. Extraídos de [Life Technologisess]. También se muestran los esquemas moleculares de cada sonda.

que se excita la molécula hasta que se observa un fotón de fluorescencia; se puede calcular según

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (2.3)$$

Típicamente los tiempos de vida de las sondas fluorescentes son cercanos a los 10 ns.

Un fenómeno muy importante a tener en cuenta a la hora de trabajar con sondas fluorescentes es el llamado fotoblanqueo (*fotobleaching*), que es un término general para denominar todos los fenómenos que tienen como resultado un apagado permanente de la fluorescencia de una molécula [Lichtman y Conchello, 2005].

En este trabajo se utilizaron principalmente cuatro sondas fluorescentes: Rodamina 6G, Rojo de Nilo (*Nile Red*, NR) y Alexa 532 y 546, cuyos espectros (a temperatura ambiente) y esquemas moleculares se muestran en la figura 2.6, donde pueden verse los picos de excitación y absorción de cada sonda junto con sus esquemas moleculares.

2.5.2. Proteínas fluorescentes visibles

El descubrimiento y desarrollo de proteínas fluorescentes visibles (*Visible Fluorescent Proteins*, VFP) y sus mutantes derivadas ha posibilitado en el último tiempo avanzar rápidamente en la investigación de un gran número de procesos intracelulares en organismos vivos [Tsien, 1998]. Estas sondas fluorescentes biológicas han permitido visualizar, localizar y seguir moléculas individuales con una alta resolución espacial y temporal, en células vivas. La ventaja más destacable de las VFP respecto de las sondas tradicionales consiste en que pueden ser expresadas por las mismas células a estudiar, utilizando vectores de expresión, lo que sumado a su baja o nula toxicidad y su alta compatibilidad con tejidos y organismos intactos las convierten en las sondas más utilizadas para la visualización de células vivas.

Actualmente existen una gran variedad de VFP que cubren en buena medida todo el espectro visible [Tsien, 2009]. La manera de trabajar con este tipo de proteínas consiste en introducir en la célula genes que codifican la fusión de la secuencia de GFP (o cualquier

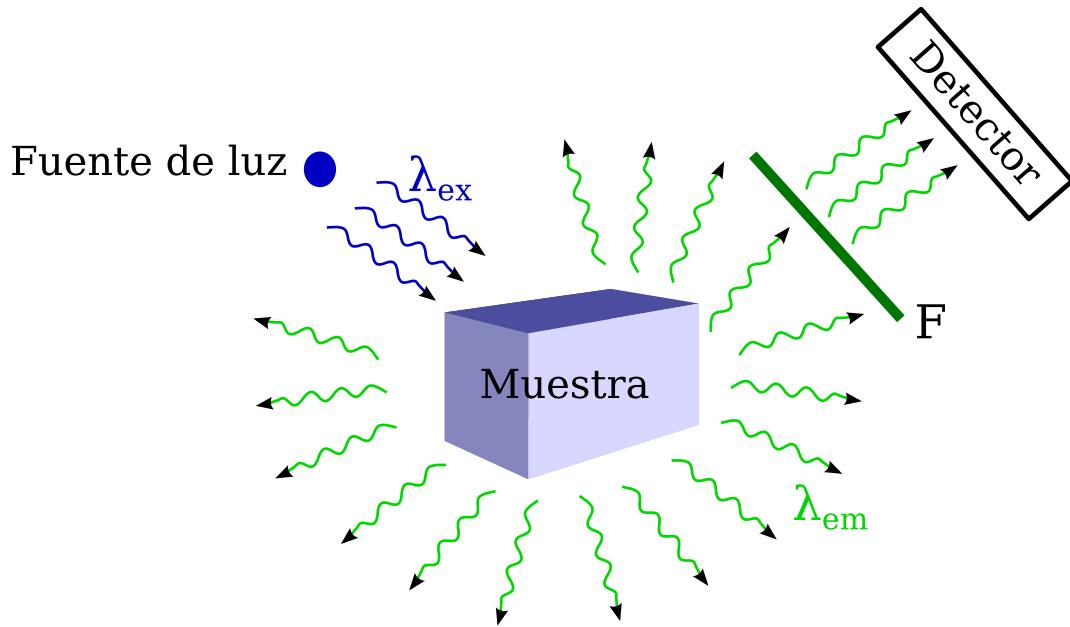


Figura 2.7: Esquema básico para la microscopía de fluorescencia. Se excita una muestra con sondas fluorescentes (o que fluoresca naturalmente) con la longitud de onda adecuada, λ_{ex} y la fluorescencia emitida a λ_{em} ($> \lambda_{ex}$ debido al corrimiento Stokes) se separa de la excitación con un filtro F para luego llegar detector.

otra VFP) junto a genes que codifican una proteína de interés. Al codificar esta secuencia, la célula produce las llamadas proteínas quimera, análogas funcionales de las proteínas de interés pero fluorescentes, lo que permite su estudio *in vivo* a partir de cualquier técnica de fluorescencia [Wang *et al.*, 2008]. En este trabajo se utilizó principalmente la proteína GFP con este esquema de trabajo.

2.6. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia consiste en utilizar este fenómeno como método de contraste para realizar imágenes de una muestra que se desea estudiar. Esta técnica se ha transformado en una herramienta esencial para la biología y para la ciencia de materiales, debido a que sus peculiares atributos no pueden ser obtenidos con otros métodos de contraste. La utilización de sondas fluorescentes que permiten el marcado específico y preciso de distintas entidades químicas ha permitido la identificación de entidades sub-celulares: el procedimiento consiste en unir químicamente las sondas fluorescentes a cierta zona o estructura de interés y luego obtener información espacio-temporal y/o dinámica a través de la observación de fluorescencia.

La implementación de este tipo de técnica se basa siempre en el esquema básico que se muestra en la figura 2.7. Se utiliza una fuente de luz para excitar las sondas fluorescentes en la muestra, con los filtros espectrales adecuados para asegurar una correcta excitación y se colecta la fluorescencia emitida para luego filtrarla y separarla de la excitación, hecho que es posible gracias al mencionado corrimiento de Stokes.

2.7. Diseño, construcción y caracterización del microscopio combinado

A lo largo de los años han surgido diversos tipos de microscopías que explotan de distinta manera el fenómeno de fluorescencia y cada una de estas implementaciones recibe un nombre específico según la técnica o implementación específica. Dos de las mas utilizadas son la Microscopía de Fluorescencia *wide field* o epifluorescencia y la Microscopía Confocal, entre otras tales como la Microscopía de Fluorescencia por Reflexión Total interna (*Total Internal Reflexion Fluorescence Microscopy*, TIRFM), Microscopía de Disco Rotante (*Spinning Disk Fluorescence Microscopy*, SDFM) y la Microscopía de Fluorescencia por “Hoja de papel” (*Light Sheet Fluorescence Microscopy*, LSFM).

En este trabajo se implementaron las dos primeras y a continuación se describe la microscopía wide field, mientras que la microscopía confocal será introducida en el capítulo 4.

Microscopía de fluorescencia *wide field*

La microscopía de fluorescencia *wide field* (WF) o epifluorescencia consiste en iluminar ampliamente la muestra para excitar conjuntamente una gran zona de la muestra. Luego la fluorescencia emitida es colectada y filtrada para remover la excitación y luego ser detectada en con un detector bidimensional, típicamente una cámara o el ojo humano.

Una manera de implementar esto consiste en tomar la luz de una lámpara de espectro amplio (por ejemplo, mercurio) y filtrarla con un filtro de excitación para seleccionar las longitudes que llegan a la muestra, λ_{ex} , como se esquematiza en la figura 2.8. Luego se hace reflejar esta luz en un espejo dicroico, que tiene alta reflectividad para estas longitudes de onda pero alta transmisión para longitudes de onda mayores. Se coloca una lente para enfocar la luz de excitación en el plano focal trasero de un objetivo de microscopio, lo que llevará a una iluminación uniforme en la muestra, utilizando todo el campo visual del objetivo. Luego la fluorescencia emitida es colectada nuevamente por el objetivo de microscopio y se transmite en el espejo dicroico. Para asegurar que las longitudes de onda de excitación no lleguen al detector, un segundo filtro, llamado filtro de emisión se coloca en el camino hacia el detector. Finalmente, la llamada lente de tubo forma una imagen final sobre el CCD de una cámara digital.

Cabe notar que los microscopios de fluorescencia invertidos disponibles comercialmente tienen un arreglo similar al expresado, con el conveniente agregado de un ocular que permite observar la muestra directamente con el ojo, permitiendo una inspección en tiempo real de la muestra sin la necesidad de digitalizar la información.

2.7. Diseño, construcción y caracterización del microscopio combinado

En esta sección se presenta el detalle del diseño, construcción y su posterior caracterización del microscopio combinado.

2.7.1. Microscopio de fuerza atómica LEC

El AFM consta de un cabezal y una platina piezoeléctrica montados sobre una base de acero, una electrónica de control que incluye el lazo de control y una PC que comanda el

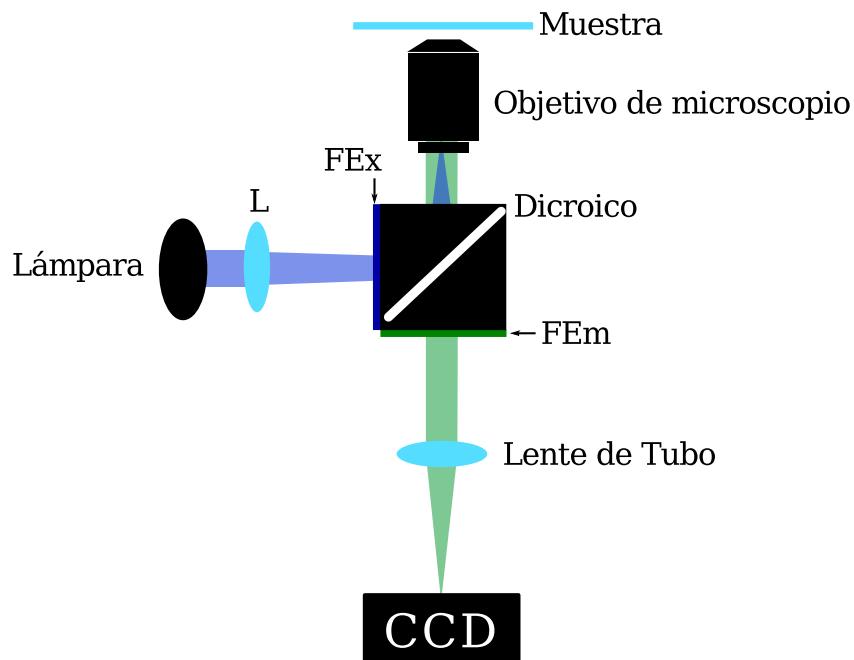


Figura 2.8: Esquema conceptual de la microscopía de *wide field*. La muestra es iluminada por la luz de una lámpara luego de pasar por el filtro de excitación (FEx) y reflejada por el espejo dicroico. La iluminación comprende todo el campo visual del objetivo. La fluorescencia emitida de los distintos puntos de la muestra es colimada por el objetivo y filtrada por el espejo dicroico y luego el filtro de emisión (FEm) para remover toda la luz de excitación y así solo detectar la fluorescencia. Por último, la lente de tubo forma imagen en el detector bidimensional (CCD).

equipo y almacena los datos. En la figura 2.9 se muestra esquemáticamente los componentes del AFM, que se describirán en detalle a continuación.

El elemento central es la electrónica de control, fabricada por RHK Technology Corp, que tiene su propio software de control. Consta de dos módulos: el AFM100 y el SPM100. En el primero se toman las señales del detector de cuatro cuadrantes y se generan las señales de deflexión normal y lateral. Estas señales son enviadas al SPM100 que compara la señal normal con el *set point* y corrige la posición axial de la muestra para mantenerlas iguales gracias al lazo de control (*feedback loop*). En este equipo también se generan las señales de barrido lateral que permiten escanear la posición de la muestra mientras se digitalizan las señales de deflexión normal y lateral, con las que luego se reconstruye una imagen. Los paneles frontales de la electrónica permiten modificar los parámetros de ganancia para las señales de deflexión y para el lazo de control.

Una PC comanda el AFM utilizando el programa propietario XPMPro (versión 2.0.0.5) de la empresa que comercializa la electrónica. El programa permite realizar imágenes con distintas cantidades de puntos, en distintas zonas de la muestra y a distintas velocidades, con distintos ángulos, entre otras opciones. Se puede trabajar en el modo contacto o en el modo intermitente o bien realizar espectroscopías de fuerza. Además permite medir en función del tiempo cualquiera de las señales presentes en el equipo a una frecuencia de adquisición seleccionable.

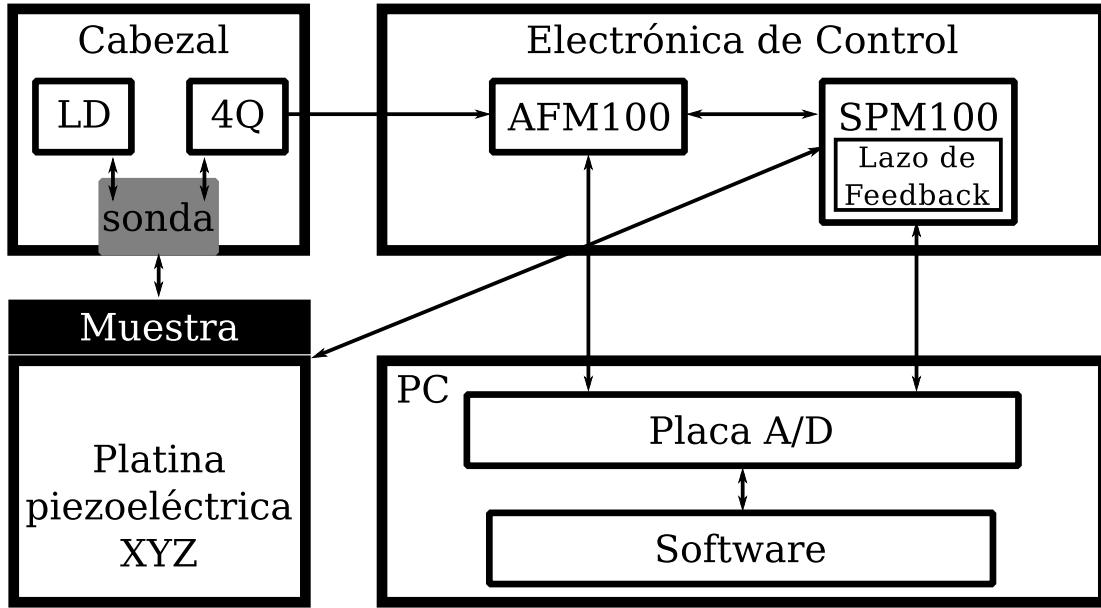


Figura 2.9: Representación esquemática del AFM construido en el LEC. Se tienen 4 bloques fundamentales: el cabezal, la electrónica de control, la platina piezoeléctrica XYZ y la PC. En el cabezal se generan las señales debido a la interacción punta-muestra, que son tomadas y procesadas por la electrónica. Además ésta genera las señales para el barrido lateral y de movimiento axial para la platina piezoeléctrica. La PC digitaliza la información y comanda el equipo a través de una placa A/D y un *software* comercial.

Cabe notar que este programa tiene un formato propio para guardar las mediciones, de extensión sm4. Se desarrolló un programa de MATLAB capaz de leer este tipo de archivos (se trata de un archivo binario) con la ayuda del manual del XMPPro, lo que permitió automatizar el análisis de las mediciones realizadas, en cualquiera de los modos de uso. Este programa está disponible en el servidor de GitHub³ y otros grupos con este equipo han estado utilizando.

En la figura 2.10 se muestra un esquema de las partes del microscopio y un esquema de los elementos del cabezal (a), junto con una fotografía del mismo (b). La luz proveniente del diodo láser es enfocada sobre el *cantilever* de la sonda que entra en contacto con la muestra y se deflecta consecuentemente. La reflexión es enviada a un detector de cuatro cuadrantes que se conecta a la electrónica para el cómputo de las señales de deflexión normal y lateral. Se introdujo el divisor de haz (BS) para poder iluminar desde arriba la muestra y la sonda a la hora de utilizar el microscopio combinado. La sonda es fijada en un soporte especialmente diseñado, que se une a la pieza principal con imanes, dotado de un elemento piezoeléctrico que permite poner a oscilar el sensor de fuerza para trabajar en el modo intermitente. Además el soporte tiene una pieza en forma de L que se utiliza para trabajar en líquido.

Para la alineación inicial se utiliza el posicionador angular que sostiene el diodo láser, lo que permite posicionar el láser exactamente en la punta del *cantilever*. Luego se utiliza el posicionador angular del espejo para enviar la reflexión al centro del detector de cuatro

³ https://github.com/caldarolamartin/read_sm4_files.

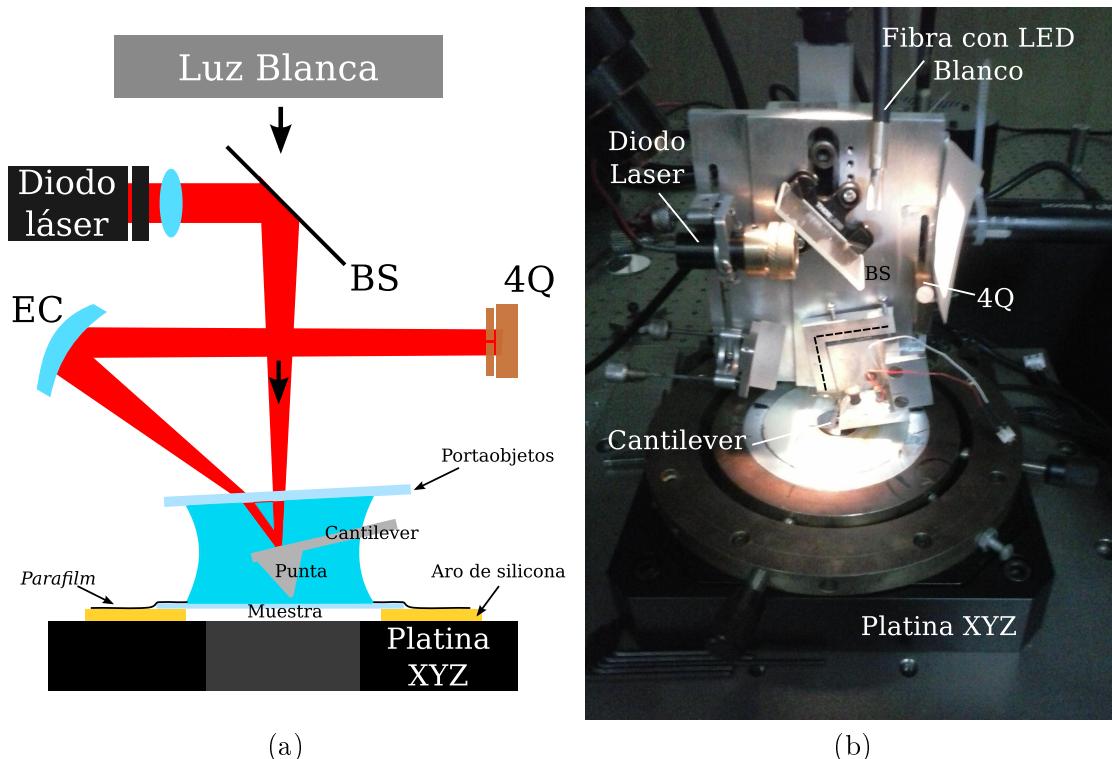


Figura 2.10: Detalle del cabezal de AFM construido en el LEC. (a) Esquema del cabezal de AFM, que funciona bajo líquido. Se utiliza un diodo láser como fuente de luz que es enfocado sobre el *cantilever* y su reflexión enviada a un detector de cuatro cuadrantes con un espejo curvo (EC). Se esquematiza el dispositivo utilizado para trabajar en entorno líquido, que consta de un cubreobjetos para mantener plana la interfase aire-líquido. Se colocó un divisor de haz (BS) para poder iluminar la muestra desde arriba con un LED blanco acoplado a un conjunto de fibras ópticas. El sensor de fuerza entra en contacto con la muestra que está montada en una plataforma piezoeléctrica XYZ, de precisión subnanométrica y alta repetibilidad. (b) Fotografía del cabezal, donde se marcan las piezas mencionadas, en particular se muestra una línea punteada sobre el dispositivo para trabajar bajo líquido.

2.7. Diseño, construcción y caracterización del microscopio combinado

cuadrantes, de manera tal que genere una señal de deflexión normal (y lateral) nula. La pieza que sostiene todos los elementos del cabezal está fijado a una plataforma de acero con un posicionador XYZ (9066-XYZ, Newport) con tornillos motorizados (CMA-12PP, Newport), comandados un controlador digital (ESP300, Newport), que permite ubicar la sonda en una posición determinada XY y realizar el acercamiento punta-muestra de manera controlada y automática. Además todo el cabezal puede rebatirse hacia atrás en caso de ser necesario. Para el control de los tornillos motorizados se desarrolló un programa en la interfaz LabView de control que conecta la PC con el controlador de los tornillos y permite al usuario seleccionar la posición del sensor de fuerza de manera cómoda, controlada y precisa.

La mencionada plataforma de acero que oficia de base para el microscopio AFM sostiene también a la platina piezoeléctrica XYZ (Modelo P-517.3cl, Physik Instrumente GmbH and Co, PI) que tiene un hueco en el centro para poder utilizarla en microscopios ópticos. El rango de barrido de la misma es $100\text{ }\mu\text{m}$ en la dirección lateral y $20\text{ }\mu\text{m}$ en la dirección axial. Esta platina cuenta con un controlador (E-516, PI) que mide la posición de la platina en tiempo real y un amplificador (E-503, PI) que amplifica la tensión de entrada (que debe variar entre 0 y 10 V) y genera la alta tensión necesaria para alimentar los materiales piezoeléctricos. Además el equipo cuenta con un servidor de lazo cerrado (E-509, PI) que asegura un movimiento lineal de la platina, proporcional a la tensión de entrada. El factor de proporcionalidad para los ejes laterales es de $10\text{ }\mu\text{m}/\text{V}$ y para el axial $2\text{ }\mu\text{m}/\text{V}$.

Luego de la primer versión de este cabezal, desarrollado durante la tesis doctoral de Martín Masip [Masip, 2011], la principal modificación al diseño del cabezal de AFM durante la presente tesis, consiste en la implementación del trabajo bajo líquido, hecho fundamental para poder llevar a cabo mediciones en células vivas. Con este fin se diseñó un suplemento para el soporte de la sonda, que permite mantener fija la superficie del líquido de trabajo en la zona donde pasa el láser para llegar al *cantilever*, como muestra en la figura 2.10. Este punto fue logrado con un portaobjetos de microscopio que mantiene la superficie plana y estable, evitando deflexiones extra en el haz. Para obtener un diseño final funcional fueron necesarias diversas modificaciones menores⁴ en el diseño de la pieza que sostiene al cabezal, como la implementación de una corredera para permitir cambiar la posición del espejo, necesaria para pasar a trabajar bajo líquido.

Caracterización del funcionamiento del AFM

El primer experimento realizado en el AFM consistió en verificar la calibración, es decir, asegurarse que las distancias medidas en las imágenes son correctas y que no hay deformaciones. Para ello se utilizó como muestra patrón una grilla de calibración (TGZ01, μMash) que presenta escalones de 25 nm de altura en un arreglo periódico en una dirección (con período de $3\text{ }\mu\text{m}$) y simetría de traslación en la otra. Se realizaron imágenes en el modo contacto y en el modo intermitente en aire y luego en modo contacto trabajando bajo agua, que se muestran en la figura 2.11. En estas imágenes de topografía se puede ver un buen contraste en los escalones y que el período de la grilla coincide con el informado por el fabricante.

Luego se realizó un análisis de alturas para verificar la calibración en la dirección axial. Se confeccionaron los histogramas de alturas correspondientes a las imágenes en

⁴Estas modificaciones fueron realizadas exitosamente con la valiosa ayuda del Taller Mecánico del Departamento de Física y los técnicos a cargo.

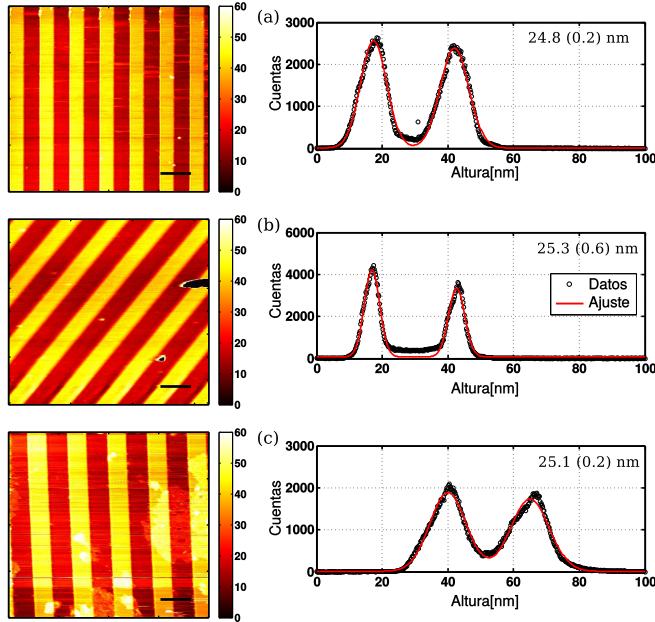


Figura 2.11: Imágenes de topografía e histogramas de altura de una grilla de calibración. Panel izquierdo: Imágenes de la grilla en los distintos modos de trabajo (a) contacto en aire, (b) intermitente en aire y (c) contacto en líquido. Se observa que el período medido para la grilla coincide con el informado por el fabricante, lo que muestra que el microscopio está correctamente calibrado en los ejes laterales. Panel derecho: Histogramas de altura en cada modo de trabajo. Se indica el valor obtenido para la diferencias de altura entre los picos observados. La altura medida para el escalón coincide en todas las imágenes con el valor informado por el fabricante, ($25,0 \pm 0,5$) nm.

cada modo de trabajo. En estos histogramas, el valor relevante es la diferencia entre los picos, que corresponde a la altura de los escalones. Se realizaron ajustes de dos gaussianas sumadas a cada distribución de alturas y en cada gráfico se muestra la diferencia entre la posición de los picos obtenidos en el ajuste. Puede verse que los valores de altura obtenidos coinciden dentro del intervalo de confianza entre sí y con lo informado por el fabricante, hecho que comprueba la correcta calibración del microscopio y su correcto funcionamiento.

Como se discutió anteriormente, además de obtener información topográfica, el microscopio de fuerza atómica puede ser utilizado para medir fuerzas. Para ello es necesario el conocimiento de la constante elástica del *cantilever* k_c , necesaria para traducir la deflexión normal medida en valores de fuerza.

La técnica más utilizada para determinar experimentalmente la constante elástica de los sensores de fuerza es la conocida como método térmico (*thermal tune method*) [Hutter y Bechhoefer, 1993; Levy y Maaloum, 2002]. Este método consiste en considerar al cantilever como un oscilador armónico de un grado de libertad en contacto térmico con el ambiente a temperatura T_a . El Teorema de Equipartición establece que el valor promedio de cada término cuadrático del Hamiltoniano debe ser proporcional a la temperatura ambiente T_a ,

2.7. Diseño, construcción y caracterización del microscopio combinado

de donde se puede despejar la constante elástica del oscilador

$$k_c = \frac{k_b T_a}{\langle x^2 \rangle}, \quad (2.4)$$

donde k_b es la constante de Boltzmann. Si se adquiere una serie temporal de las fluctuaciones del *cantilever* libre (completamente alejado de la muestra) con suficiente frecuencia de muestreo y se calcula la densidad espectral de potencia (*power spectral density*, PSD) se obtendrá una curva lorenziana centrada en la frecuencia de resonancia (despreciando otras fuentes de ruido). El área debajo de esta curva es igual al desplazamiento cuadrático medio $\langle x^2 \rangle$ del oscilador [Hutter y Bechhoefer, 1993]. Con esta información y la temperatura ambiente, se puede calcular la constante elástica usando la ecuación 2.4.

Este método puede ser refinado teniendo en cuenta más grados de libertad y la forma específica del *cantilever* (rectangular, V, entre otras) [Levy y Maaloum, 2002]. Para el caso específico de los *cantilevers* en forma de V se tiene una pequeña corrección

$$k_c = 0,778 \frac{k_b T_a}{\langle x^2 \rangle}. \quad (2.5)$$

Con este método se calibraron todos los sensores de fuerza utilizados en este trabajo. La adquisición se realiza en el modo de adquisición temporal y con un programa especialmente desarrollado en MATLAB se analiza la serie temporal y se obtiene la PSD. Como ejemplo, la medición de un sensor de fuerza de nitruro de silicio con una constante nominal de 0,12 N/m arrojó un valor de $(0,13 \pm 0,02)$ N/m.

2.7.2. Microscopio de fluorescencia *Wide field*

Se construyó un microscopio *wide field* (WF) invertido que puede ser utilizado en el modo transmisión, es decir, iluminando desde arriba la muestra y detectando la luz que se transmite a través de la misma o en el modo fluorescencia, donde se ilumina la muestra a través de un objetivo de microscopio y se colecta la fluorescencia generada con el mismo objetivo para luego ser separada espectralmente de la excitación y ser enviada a una cámara.

El esquema básico se muestra en la figura 2.12. Se puede trabajar con dos modos de iluminación: en transmisión y en fluorescencia. Ambos modos comparten el camino de detección así como el detector; se trata de una cámara CCD, modelo Alta2000 (*Apogee Imaging Systems Inc.*), que puede ser enfriada hasta 50 grados debajo de la temperatura ambiente. En el apéndice A se presentan detalles de las especificaciones de la cámara.

Cuando se trabaja en el modo transmisión, se utiliza una lámpara de luz blanca para iluminar la muestra desde arriba y observar la luz que se transmite a través de la misma. En este caso el objetivo de microscopio (Plan Neofluar, 40x NA=0.75, Zeiss) colecta la luz transmitida por la muestra y la colima para que viaje hasta la lente de tubo, que forma la imagen final en la cámara. El objetivo a su vez se encuentra montado sobre una plataforma lineal de movimiento que permite su desplazamiento controlado en la dirección vertical, para alcanzar el punto donde la muestra está en foco. Esto se logra con un actuador (Picomotor, Modelo 8302, New Focus) que a su vez puede ser controlado manualmente.

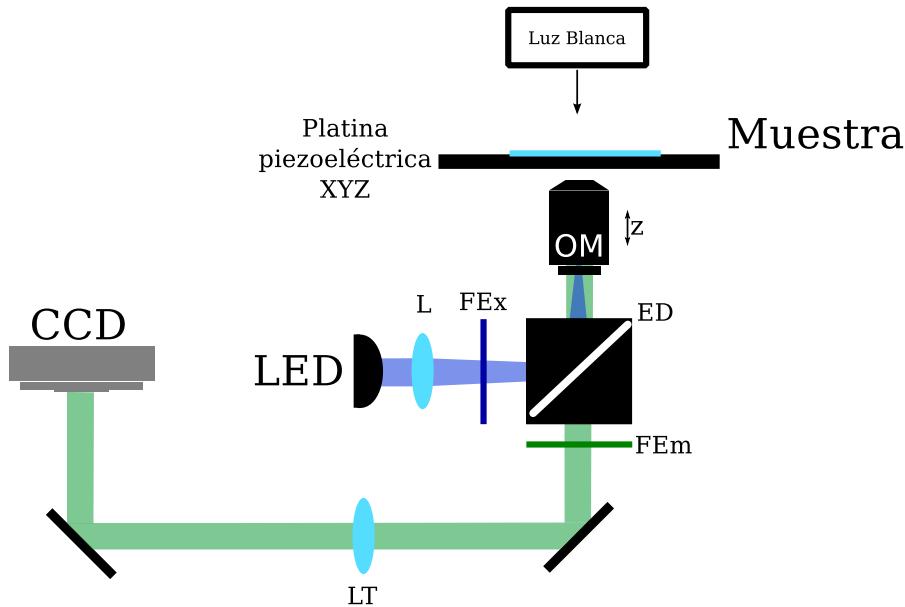


Figura 2.12: Esquema del microscopio óptico *wide field*. La muestra se monta en la platina piezoeléctrica XYZ y puede ser iluminada desde arriba con una luz blanca o desde abajo con un LED azul, que se utiliza como fuente de luz para la microscopía de fluorescencia. La lente L forma imagen del LED en el plano focal trasero del objetivo. Se selecciona el rangopectral de excitación con el filtro de excitación (FEx), que se envía hacia el objetivo de microscopio (OM) con un espejo dicroico (ED). La fluorescencia emitida por la muestra es colectada por el mismo objetivo y se transmite a través del espejo dicroico y del filtro de emisión (FEm) para luego enfocarse en una cámara CCD con una lente de tubo (LT)

En el caso del modo fluorescencia, la fuente de luz utilizada es un LED azul (Tolket SRL) cuyo pico de emisión se encuentra en 453 nm. La luz proveniente del LED es filtrada espectralmente por un filtro de excitación (ET470/40x, Chroma Technology Corp.) enfocada en el plano focal trasero del objetivo de microscopio para asegurar una iluminación amplia en la muestra. En el camino, la luz se refleja en el espejo dicroico (T495lpxr, Chroma Technology Corp.), que tiene alta reflectividad para las longitudes de onda de excitación y alta transmisión para las de emisión. En el apéndice B se muestran los espectros de estos elementos.

Luego, la fluorescencia emitida por la muestra es colectada nuevamente por el objetivo y colimada para pasar por el filtro de emisión (ET525/50m, Chroma Technology Corp.), que remueve por completo la luz de excitación y permite detectar la banda de emisión deseada. Finalmente la lente de tubo de distancia focal 20 cm (doblete acromático, AC254-200-A, Thorlabs) forma la imagen final en el CCD de la cámara. Cabe notar que esta combinación de filtros es la ideal para la utilización de la proteína fluorescente verde, GFP.

La instrumentación del microscopio WF consiste principalmente en controlar la cámara CCD. El fabricante provee un programa propietario para controlarla pero este no permite ningún tipo de sincronización, por lo que se optó por utilizar un programa *home-made* escrito en LabView que utiliza la librería (dll) provista por el fabricante para controlar la

2.7. Diseño, construcción y caracterización del microscopio combinado

cámara. Este programa fue diseñado e implementado en sus primeras versiones por Martín E. Masip y Francisco Balzarotti en sus respectivas tesis doctorales, realizadas en el LEC. En este trabajo se generó una nueva versión de la misma plataforma con algunas mejoras menores y con la posibilidad de sincronizarse con otro programa.

Por otro lado, se desarrolló un programa que utiliza una placa digitalizadora (USB-2527, fabricada por *Measurement Computing*, MCC) para controlar la potencia del LED de manera continua desde apagado hasta su valor máximo y así controlar la iluminación en la muestra. Esto resulta fundamental en un experimento de fluorescencia donde no se desea excitar a la muestra de manera innecesaria debido al fotoblanqueo. Este programa contiene un modo que permite realizar experimentos de larga duración con el siguiente esquema: enciende el LED para adquirir una imagen con la CCD utilizando con cierto tiempo de exposición definido por el usuario y luego espera con el LED apagado otra cantidad de tiempo determinada para luego repetir el ciclo.

Caracterización del microscopio WF

En primer lugar se realizó una calibración del microscopio *wide field*, que consiste obtener un factor que permite traducir las distancias medidas en la imagen en distancias físicas en la muestra. Para eso se utilizó una grilla de calibración comercial (Zeiss número de catálogo 474026-0000-000), que consta de un patrón de líneas periódicas con un período de $10\text{ }\mu\text{m}$, en el modo transmisión. Al colocar esta grilla como muestra y obtener imágenes del patrón se puede transformar una distancia en píxeles a un tamaño real en la muestra. Con este procedimiento se obtuvo un factor de calibración de $(150,150 \pm 0,001)\text{ nm/px}$, que se utilizó a lo largo de este trabajo para medir distancias en las imágenes tomadas. Cabe destacar que esta calibración es válida en tanto el objetivo utilizado sea el mismo y la posición relativa entre la cámara y la lente de tubo no cambien⁵.

En segundo lugar se estudió el ruido de oscuridad que se detecta en la cámara, es decir, la señal que se observa cuando todas las fuentes de luz se encuentran apagadas (esto incluye la señal generada por la leve luz ambiente que se necesita para operar el microscopio). La figura 2.13 (a) muestra la imagen del ruido de oscuridad (con todas las fuentes de luz apagadas) de la CCD, utilizando un tiempo de integración de 1 s, a temperatura ambiente (22°C). Se observa un valor medio de 845 cuentas con una desviación relativa del 3,71 %. Cabe notar que este valor disminuye linealmente con cuando disminuye la temperatura de la cámara y aumenta con el tiempo de integración.

Luego se estudió la uniformidad en la iluminación del microscopio WF, en el modo fluorescencia. Esto resulta importante a la hora de realizar imágenes en una muestra de interés, pues las imágenes obtenidas siempre son una convolución entre la iluminación, la detección y la muestra. Para esto se utilizó como muestra un portaobjetos de plástico fluorescente (*autofluorescent plastic slide*, Chroma Technology Corp.), que provee una muestra de fluorescencia espacialmente uniforme, por lo que se espera obtener una imagen de fluorescencia que evidencie los defectos en la iluminación. En la figura 2.13 muestra la imagen obtenida, en todo el campo visual del microscopio. En los bordes de la imagen la intensidad decrece notablemente pues la óptica de colección es de una pulgada de diámetro, lo que limita el campo visual. Sin embargo, la variación relativa de intensidad I_r del 7,70 % (se

⁵Cuando alguno de estos parámetros cambió se repitió el procedimiento para obtener una nueva calibración.

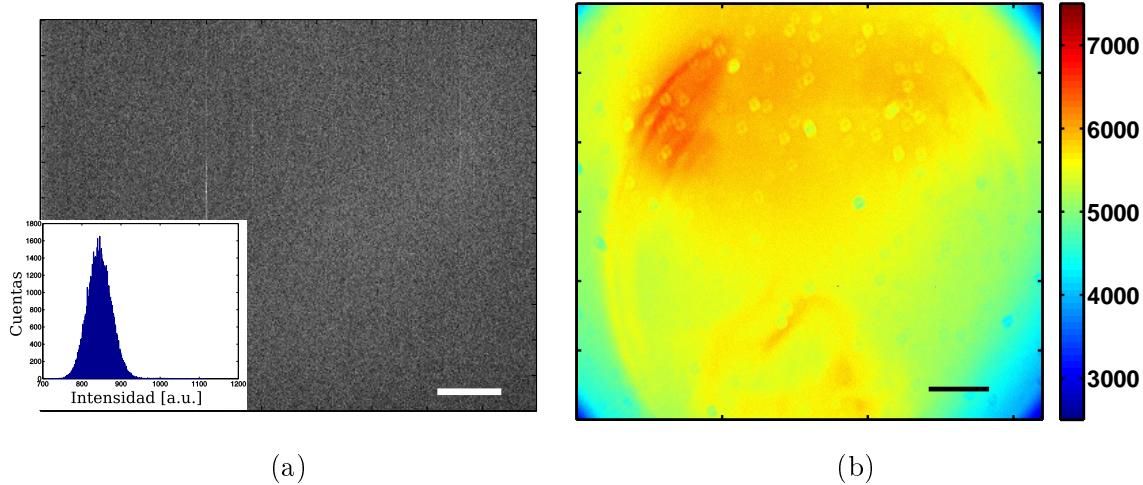


Figura 2.13: Caracterización del microscopio *wide field*. (a)Imagen de oscuridad, es decir, con las fuentes de iluminación y el diodo láser del AFM apagados ($t_{int} = 1\text{s}$). (b)Imagen de fluorescencia del portaobjetos fluorescente. Se puede ver que en los bordes de la imagen la intensidad es notablemente menor, debido a estar en el borde del objetivo. Las imperfecciones de la imagen corresponden a suciedad en la muestra. La variación total relativa resulta de un 7.70 %.

toma $I_r = s/I_m$, donde s indica la desviación estándar e I_m el valor medio de la intensidad de toda la imagen). Esta variación relativa baja a un 4 % si se ignora una franja de 310px de ancho desde los bordes de la imagen.

Finalmente, para evaluar el desempeño del microscopio de fluorescencia con una muestra biológica, se realizaron imágenes de un muestra comercial de células fijadas (*Molecular Expression*), que consiste en células de arteria pulmonar bovina, fijadas químicamente e inmunomarcadas con anticuerpos anti-tubulina unidos a al fluorósforo BODIPY que marca los microtúbulos. Se realizaron imágenes de fluorescencia de los microtúbulos, pues se encuentran marcados con un fluorósforo espectralmente accesible con los filtros del microscopio, por su similitud con la GFP. La figura 2.14 se muestra la imagen obtenida, que es representativa de las células en la muestra y en el recuadro pequeño se muestra un histograma de intensidades de la misma. Se pueden observar claramente los microtúbulos, que forman una compleja red que sirve de sostén mecánico para la célula.

2.7.3. Microscopio combinado

El presentado microscopio AFM y el microscopio óptico *wide field* fueron diseñados desde un principio para coexistir en una misma plataforma, que es el microscopio combinado. La plataforma que sirve de base para el AFM se encuentra unos 10cm por encima de la mesa óptica para permitir que debajo de ella se coloquen los ya mencionados componentes del microscopio óptico. Dado que para el funcionamiento del AFM se utiliza un diodo láser enfocado sobre el *cantilever*, fue necesario colocar un filtro *notch* para 658 nm (NF03-658E-25, Semrock) para evitar su detección en la CCD del microscopio óptico.

En la figura 2.15 (a) se muestra un esquema del microscopio combinado completo y en (b) una fotografía del mismo, indicando los distintos componentes. Notar en el esquema

2.7. Diseño, construcción y caracterización del microscopio combinado

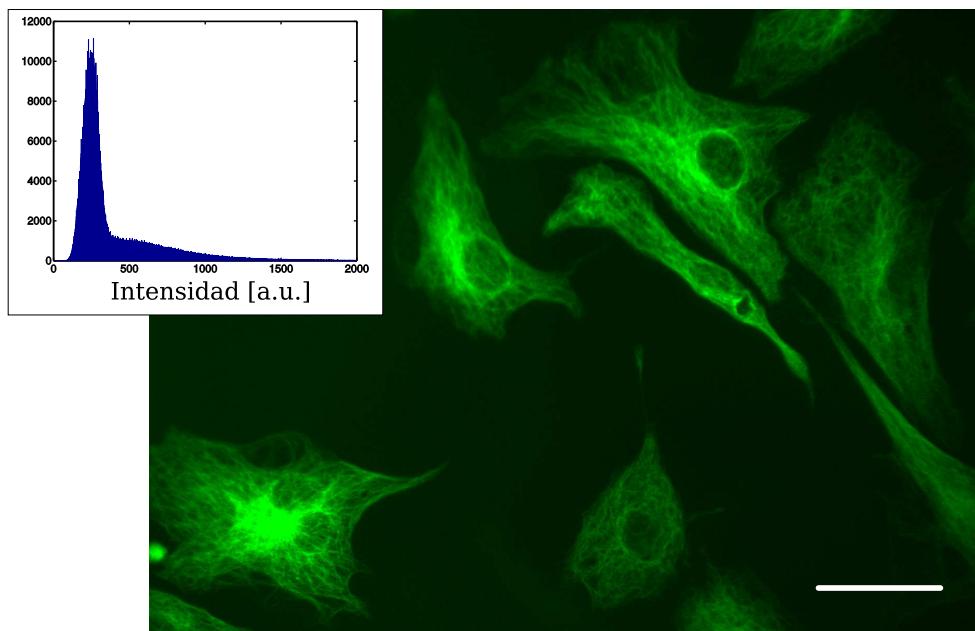


Figura 2.14: Imagen de fluorescencia células fijadas. Se trata de células de arteria pulmonar bovina, fijadas químicamente e inmunomarcadas con anticuerpos anti-tubulina unidos a al fluorósforo BODIPY. Barra de escala: 50 μm . El recuadro pequeño muestra un histograma de intensidades de la imagen, con un pico grande en el valor de fondo.

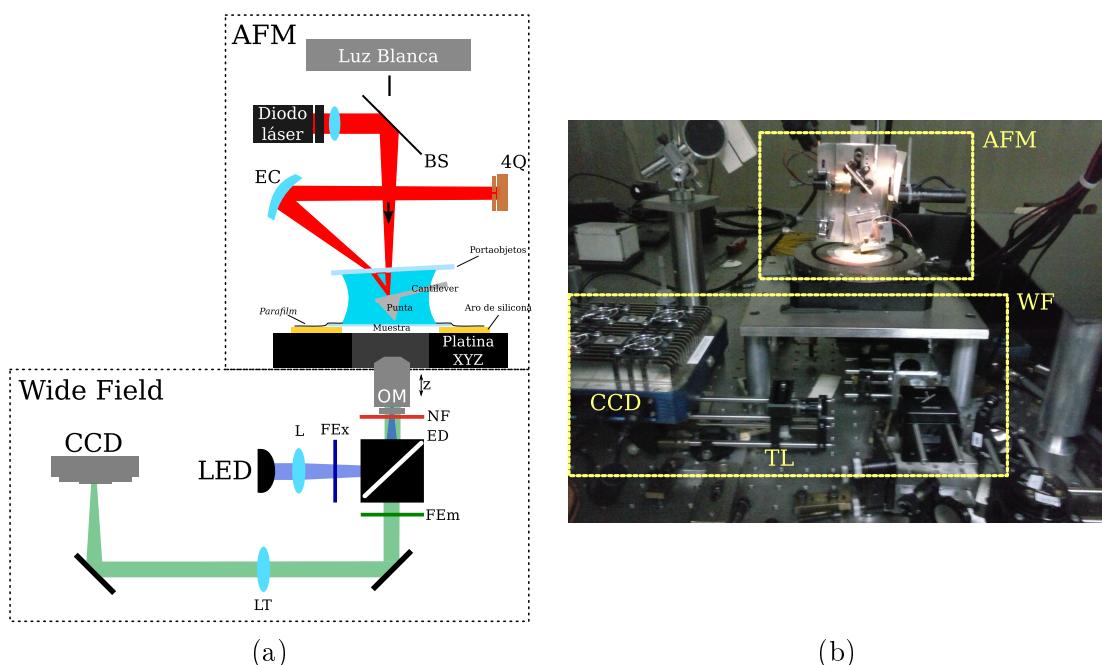


Figura 2.15: Microscopio combinado AFM-óptico. (a)Se trata del los esquemas presentados para cada microscopio, colocados juntos. Cabe notar que se agregó un filtro notch (NF) para 658 nm para evitar que la cámara detecte el diodo láser del AFM. (b)Fotografía del microscopio combinado, resaltando las dos partes.

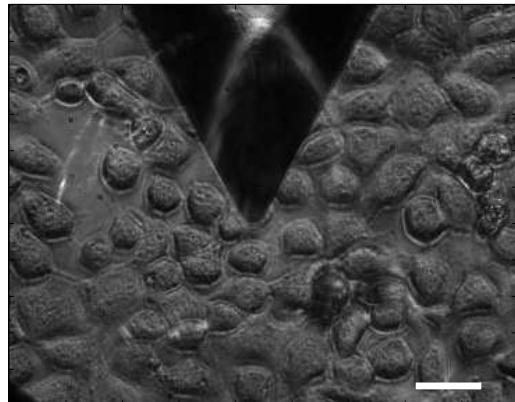


Figura 2.16: Imagen de transmisión con el sensor de fuerza. Se observan las células HC11 en la muestra y el sensor de fuerza del AFM sobre una de ellas, lo que provoca una sombra con la forma del *cantilever*. Barra de escala: 30 μm .

la presencia del filtro *notch* para evitar la detección del láser del AFM, indispensable para el uso simultáneo de las dos técnicas.

Con este dispositivo experimental se puede realizar simultáneamente cualquiera de las técnicas del microscopio de AFM con las técnicas de microscopía óptica. El primer paso para esto es colocar el sensor de fuerza dentro del campo visual del microscopio óptico. Esto se logra fácilmente debido a que la mecánica general del microscopio fue diseñada para que el sensor de fuerza y el objetivo de microscopio estuvieran inicialmente alineados y a la utilización del posicionador XYZ que sostiene todo el cabezal del AFM.

Una vez seleccionada la zona de la imagen óptica que se desea estudiar con el AFM, se posiciona el sensor de fuerza sobre de la misma mientras se monitorea su posición con el microscopio óptico en el modo transmisión. En esa situación el *cantilever* del sensor de fuerza proyecta una marcada sombra sobre la muestra, lo que permite su rápida ubicación en la escala de los μm . Escalas por debajo del micrón se controlan directamente con la platina piezoelectrónica, al igual que el barrido del AFM. En la figura 2.16 se muestra un ejemplo de imagen de transmisión de células HC11 vivas con el sensor de fuerza en el campo visual. Se observa las células en la muestra y el sensor de fuerza en contacto sobre una de ellas.

Caracterización del microscopio combinado AFM-optico

El desempeño del microscopio combinado fue estudiado en detalle; los resultados presentados para el AFM en las secciones 2.7.1 y 2.7.2 fueron tomados en esta plataforma combinada, por lo que son igualmente válidos para el microscopio combinado. Solo resta el estudiar la influencia del funcionamiento del AFM sobre la parte óptica y viceversa.

Con este objetivo, se caracterizó la luz residual que se detecta en la cámara cuando se utiliza el modo combinado, es decir, cuando se encuentra encendido el diodo láser del AFM y la punta se encuentra en contacto con la muestra (que es transparente). La figura 2.17 muestra una imagen tomada con 1 s de tiempo de integración con el AFM en contacto con la muestra y con el lazo de retroalimentación encendido y sin la iluminación del WF, sobre una muestra de esferas fluorescentes. En este caso se observa una clara imagen de la

2.8. Combinación de topografía y fluorescencia para estudiar células vivas

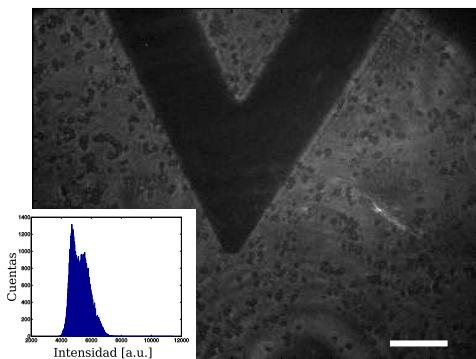


Figura 2.17: Caracterización del ruido en la CCD en el modo combinado. Imagen de una muestra de perlas fluorescentes con el DL del AFM encendido, que genera una clara imagen del *cantilever* en la CCD. La imagen fue tomada con un *binning* de 4x4 y se muestra un histograma en el recuadro pequeño. Barra de escala: 30 μm .

sombra del *cantilever* además de las esferas fluorescentes en la muestra. Esto prueba que hay cierta porción de luz proveniente del DL del AFM que pasa a través del filtro *notch* y llega al CCD. Por otro lado, el desempeño del AFM no se vio afectado por la iluminación del microscopio óptico.

2.8. Combinación de topografía y fluorescencia para estudiar células vivas

Como aplicación concreta, se demostró la posibilidad de estudiar con las técnicas ópticas y de AFM combinadas células vivas HC11. Células de esta línea celular fueron cultivadas y transfectadas con la construcción vinculina-EGFP por la Dr. Catalina von Bildering, con quien se trabajó en colaboración durante sus tesis doctoral.

En la figura 2.18 se muestran los resultados obtenidos; (a) muestra la imagen topografía, (b) la de deflexión, obtenidas con el AFM y (c) muestra la imagen de fluorescencia, donde puede verse que la proteína no sólo se acumula en las adhesiones focales sino que también está distribuida en el citoplasma. Por último en (d) se muestra también la superposición de la imagen de fluorescencia y la de deflexión, donde puede verse una excelente coincidencia.

2.9. Conclusiones

Se presentó la plataforma del microscopio combinado AFM-óptico y se caracterizó su funcionamiento en cada técnica individualmente y en conjunto. Se mostró la correcta calibración del AFM estudiando grillas calibradas y se mostró la posibilidad de medir fuerzas en el rango de los pN. También se caracterizó el desempeño del microscopio *wide field* y se visualizaron adhesiones focales en células vivas. Finalmente, se mostró el uso de las dos técnicas simultáneamente en células vivas, donde se obtuvieron imágenes simultáneas de células HC11 expresando la proteína quimera vinculina-EGFP.

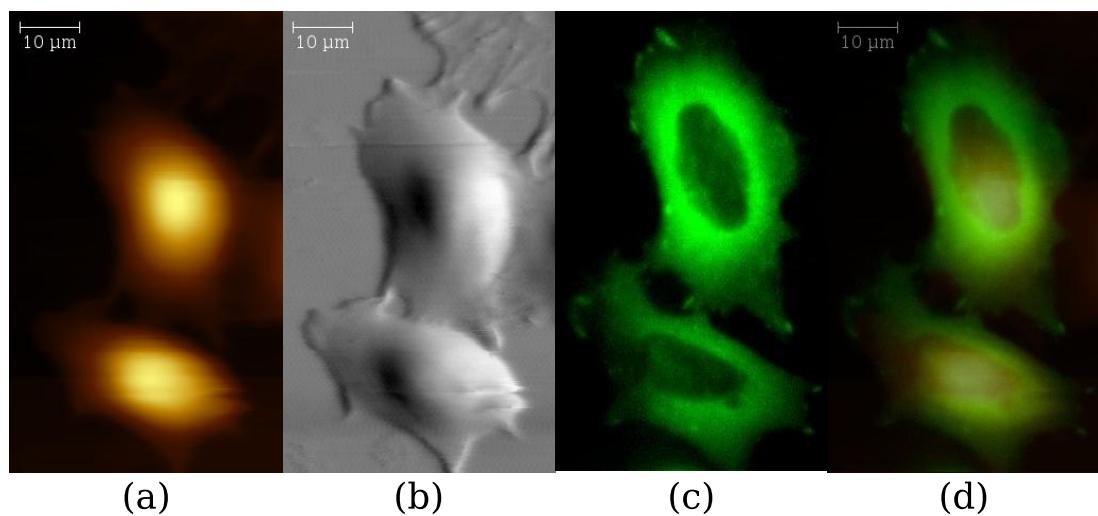


Figura 2.18: Imagen combinada AFM-fluorescencia de células vivas. (a) Imagen de topografía de dos células vivas. (b) Imagen de fuerza normal. (c) Imagen de fluorescencia de la proteína vinculina-GFP. (d) Superposición de las imágenes (b) y (c), que muestra una gran coincidencia.

Capítulo 3

Aplicaciones a la biofísica: mecanotransducción celular

En este capítulo se presenta la utilización del microscopio combinado AFM-óptico a un problema del área biofísica, específicamente en el tema de mechanotransducción celular. Se presenta una metodología de trabajo que explota la posibilidad de ejercer fuerzas mecánicas que posee el AFM, combinada con la posibilidad de estudiar dinámica de proteínas que brinda la microscopía óptica de fluorescencia. En particular, se estudia la evolución temporal de proteínas presentes en las Adhesiones Focales (FA) en respuesta a un estímulo mecánico específico, local y controlado.

El trabajo presentado en este capítulo fue diseñado y desarrollado en conjunto con el grupo del Centro de Microscopías Avanzadas, FCEyN, UBA, liderado por la Prof. Lía Pietrasanta, con quien se mantiene una estrecha colaboración de larga data.

3.1. Introducción y motivaciones

Las fuerzas mecánicas son esenciales en la función, la organización, el crecimiento y la maduración de células vivas [Chen, 2008]. Se llama **Mecanotransducción** al proceso por el cual las células convierten un estímulo mecánico en una señal bioquímica, que ocurre a dos niveles: célula-célula y célula-matriz extracelular (*Extra Cellular Matrix*, ECM).

Las llamadas **Adhesiones Focales** (*Focal Adhesions*, FAs) o sitios focales son estructuras multiproteicas especializadas, que median la interacción entre la célula y la matriz extracelular. Las FAs son estructuras planas y alargadas, de unos pocos micrones cuadrados de área que a menudo están localizadas en la periferia de las células. Se piensa que funcionan como organelas de señalización en el proceso de mecanotransducción celular e involucran más de 200 proteínas incluyendo ECM, citoesqueleto, membrana plasmática y cascadas de señalización [Zamir y Geiger, 2001; Zaidel-Bar *et al.*, 2007]. Se trata de complejos dinámicos, ya que pueden ensamblarse o desensamblarse. En el desarrollo de las FAs, se destaca el papel de la fibronectina (FN), pues dispara la formación de una adhesión al unirse a los receptores de membrana (integrinas). A nivel de citoplasma podemos mencionar a proteínas como vinculina, la zixina, la talina, la paxilina, y la quinasa de adhesión focal (*Focal Adhesion Kinase*, FAK).

La adhesión de la célula a la ECM es un proceso de muchas etapas que depende de la fuerza aplicada en la célula [Geiger *et al.*, 2001; Zaidel-Bar *et al.*, 2004; Lawson y Schlaepfer, 2012]. La formación de los complejos focales iniciales es disparada por la unión de los receptores de integrina con la fibronectina, a través de la secuencia peptídica RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico), mediada por fuerzas mecánicas. Luego, este complejo focal naciente evoluciona a una adhesión focal madura en un proceso jerárquico: las primeras proteínas reclutadas son los heterodímeros $\alpha\beta$ -integrina, talina y paxilina, seguidos de vinculina, α -actinina y FAK [Zaidel-Bar *et al.*, 2004]. La formación de una adhesión focal madura viene acompañada de un aumento de tamaño y con el reclutamiento de la proteína zixina, junto con la unión a los filamentos de actina.

Cada etapa de este proceso tiene distintas escalas de tiempo. Se han reportado en la literatura que los tiempos de reclutamiento para la vinculina, paxilina y talina rondan las decenas de segundos, mientras que el engrosamiento de los sitios focales requiere algunos minutos [Galbraith *et al.*, 2002]. Sin embargo, la maduración en una adhesión focal bien establecida puede requerir de hasta una hora [Zamir *et al.*, 2000].

Sumado a esta complejidad temporal, el desarrollo de las FAs es un mecanismo que se ve fuertemente influenciado, tanto por las fuerzas internas generadas por el citoesqueleto como por las fuerzas externas aplicadas en la célula [Galbraith *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2011]. Sin embargo los detalles de cómo se transmiten las fuerzas o cómo son traducidas mecano-químicamente no se conocen. El mecanismo por el cual las células pueden variar activamente la fuerza de adhesión y cuáles son los elementos involucrados son preguntas abiertas.

El uso del microscopio de fuerza atómica se ha extendido ampliamente, sobre pasando su aplicación original de obtener información en la escala nanométrica de superficies; se ha transformado en una herramienta multifuncional indispensable para el estudio molecular en la nanobiotecnología [Müller y Dufrene, 2008]. Resulta particularmente atractiva para los problemas de esta área de la ciencia por su habilidad para ejercer y medir fuerzas en células únicas [Rotsch y Radmacher, 2000] y en moléculas individuales con resolución en

3.2. Detección de fuerzas de interacción para moléculas únicas

el rango de los pN [Müller *et al.*, 2009]. Sumado a estas capacidades, la combinación del AFM con microscopía de fluorescencia ha sido exitosamente utilizada para estudiar las respuestas globales de la célula frente a estímulos mecánicos, como por ejemplo el cambio de concentración del calcio intracelular en osteoblastos [Charras y Horton, 2002] o el cambio de ubicación de la vinculina y la actina cuando se inducen tensiones sobre el citoesqueleto en células de vasos sanguíneos [Lim *et al.*, 2012].

Se presenta aquí un esquema de trabajo que combina un AFM con un microscopio de fluorescencia *wide field* para estudiar la dinámica de distintas proteínas de adhesión en una FA individual en respuesta a un estímulo mecánico local y específico. Para eso se ejerce fuerza con la punta de AFM funcionalizada con fibronectina sobre una célula viva y simultáneamente se observa la evolución en el tiempo de la distribución espacial para las proteínas focales vinculina, FAK y zixina. Utilizando este esquema de trabajo se logró inducir el desarrollo de una adhesión focal naciente aplicando una fuerza local, evidenciado por la clara acumulación de vinculina en la zona donde se ejerce la fuerza y se caracterizó el tiempo de reclutamiento para FAK en similares condiciones experimentales. Además se observó una reorganización espacial de la zixina dentro de una adhesión focal madura. Este método y los resultados presentados a continuación fueron reportados recientemente [von Bildering *et al.*, 2015].

3.2. Detección de fuerzas de interacción para moléculas únicas

Como se mencionó en el capítulo 2, el modo espectroscopía del AFM también permite estudiar las fuerzas de interacción molecular a nivel de molécula única. Esta técnica se conoce como espectroscopía de fuerza de molécula única (*Single Molecule Force Spectroscopy*, SMFS) y fue desarrollada a mediados de la década de 1990 [Lee *et al.*, 1994; Florin *et al.*, 1994; Müller y Dufrene, 2008].

El esquema de trabajo para la SMFS consiste en ejercer fuerza sobre un par ligando-receptor monitoreando la fuerza aplicada hasta que se observe la disociación, que se evidenciará como una discontinuidad cuya magnitud corresponde con la fuerza del enlace estudiado [Bhushan, 2010]. Para implementar esta técnica se puede utilizar un AFM en el modo espectroscopía: el ligando unido a la punta sensora interactúa con su receptor específico en la muestra (o viceversa), y se realizan sucesivos ciclos de fuerza. En algún ciclo de acercamiento la interacción ligando-receptor tendrá lugar. Al avanzar en la curva de alejamiento llegará un momento en el que la fuerza que ejerce el *cantilever* es mayor que la unión ligando-receptor y esta se romperá, generando un salto abrupto en la curva de fuerza, cuyo valor en pN se corresponde con la fuerza de unión ligando-receptor [Hinterdorfer y Dufrêne, 2006].

Actualmente la SMFS ha evolucionado, especialmente en la química de funcionalización de la punta y/o de los sustratos. En particular, la implementación de un espaciador que agrega movilidad a las moléculas y, por lo tanto, aumenta la probabilidad de interacción, ha sido un avance importante para esta técnica, ampliamente utilizada. Cabe notar que la técnica no solo permite estudiar las fuerzas de unión entre moléculas únicas, sino también variables dinámicas como las constantes de disociación entre dos especies [Bhushan, 2010; Cap.28].

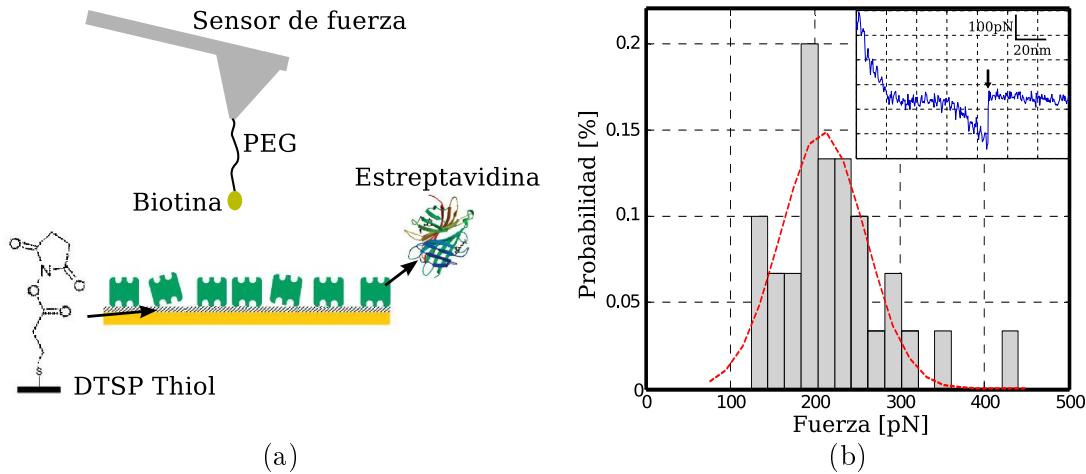


Figura 3.1: Experimento de interacción de moléculas únicas: Bio-StA.
 (a) Esquema de trabajo para el experimento. Moléculas de biotina están unidas a la punta (con un adaptador PEG) y en el sustrato se fijan las moléculas de StA utilizando tioles. Figura adaptada de von Bildering [2013]. (b) Histograma de las fuerzas de ruptura con su ajuste gaussiano, con un valor medio de (209 ± 7) pN. En el recuadro pequeño se muestra una curva de fuerza representativa en la que se ve un evento de interacción entre el par biotina-estreptavidina (marcado con la flecha). Figura adaptada de [Caldarola *et al.*, 2012b].

Se implementó esta técnica en el microscopio combinado y se estudió el sistema modelo biotina-estreptavidina (Bio-StA), para verificar con un sistema real la correcta medición de fuerzas en la escala de los pN. Se utilizaron sensores de fuerza biotiniliados comerciales (comercializados por NovaScan Technologies), que traen moléculas de biotina unidas a la punta con el adaptador flexible PEG (polietilenglicol) y se fijó la StA a un sustrato de oro *Robax*, como se muestra esquemáticamente en la figura 3.1. El procedimiento de fijación consiste en incubar el sustrato de oro 18hs en solución de tiol DTSP (ácido 3,3'-ditiodipropiónico di(N-hidroxisuccinimidil éster), Sigma-Aldrich), enjuagar y secar con nitrógeno. Luego se incuba una hora en solución de StA para obtener la muestra final [Caldarola *et al.*, 2012b; von Bildering, 2013].

Con este esquema se realizaron 225 curvas de fuerza en una posición lateral fija de la muestra, trabajando en solución de fosfato salino (PBS); se encontraron 31 curvas que evidenciaban un evento de interacción ($\sim 13\%$ de efectividad). De esas curvas se obtiene el valor del salto y se construye el histograma de la figura 3.1 (b). En el recuadro pequeño en la figura 3.1 (b) se muestra una curva representativa donde se observa un evento de interacción individual. Se realizó un ajuste gaussiano al histograma que arrojó un valor de (209 ± 7) pN para el valor medio de la fuerza, similar al valor reportado previamente [Moy *et al.*, 1994].

Estos experimentos muestran que el AFM construido es capaz de medir fuerzas en el rango de los pN y de obtener información de la fuerza de unión entre moléculas únicas, a través de la técnica de espectroscopía de fuerza de moléculas individuales.

3.3. Visualización de adhesiones focales en células vivas

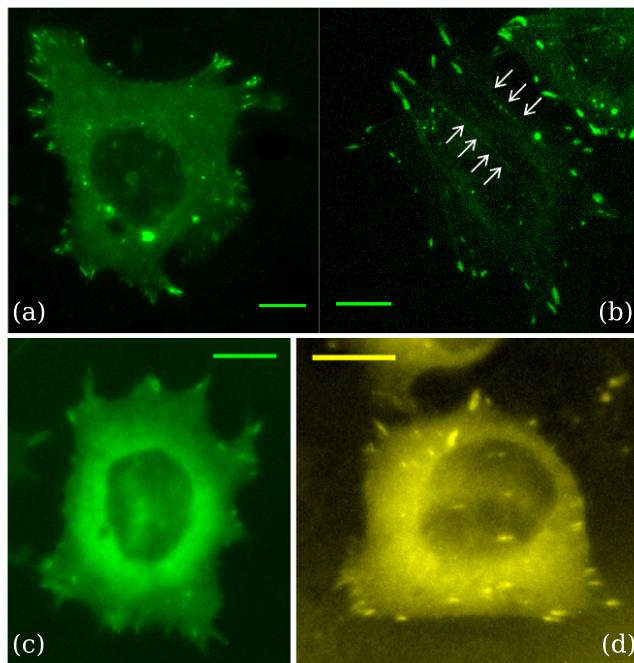


Figura 3.2: Imágenes de fluorescencia de proteínas de adhesión en células vivas. Se muestran ejemplos de imágenes de células transfectadas con las proteínas quimera zixina-EGFP (a y b) vinculina-EGFP (c) y vinculina-venus (d). La proteína zixina se localiza en las adhesiones focales, y en algunos casos (b) sobre los filamentos de actina (flechas blancas). La proteína vinculina se ubica en las adhesiones focales y se observa también en el citoplasma. Barras de escala: 10 μ m. Extraido de [von Bildering, 2013].

3.3. Visualización de adhesiones focales en células vivas

Una vez probado el correcto funcionamiento del AFM para los rangos de fuerzas de las interacciones moleculares se realizó una prueba en condiciones fisiológicas con células vivas, del microscopio de fluorescencia *wide field*.

En la figura 3.2 se muestran algunos ejemplos representativos de las imágenes adquiridas. Se trata de células vivas de la línea celular HC11, que fueron transfectadas para expresar proteínas de adhesiones focales: (a) y (b) zixina, (c) y (d) vinculina unidas a la proteína fluorescente EGFP o Venus. El cultivo celular y transfección de las proteínas de adhesión quimeras fue realizado por Catalina von Bilderling, con quien se trabajó en los experimentos de mecanotransducción celular. En las imágenes se puede observar que, además de cierta cantidad de proteína en el citosol de la célula, las adhesiones focales son claramente visibles como estructuras más brillantes alargadas en las periferias de las células. Sumado a esto, en el caso de zixina (b) se pueden apreciar los filamentos de actina, que observan como líneas rectas muy finas, remarcados con flechas blancas.

A pesar de no tratarse de imágenes confocales, estos resultados muestran la posibilidad de detectar con certeza la posición y forma de complejos focales en células vivas con el microscopio combinado AFM-fluorescencia *wide field*, lo que es de vital importancia para el experimento propuesto, que se describe en la siguiente sección.

3.4. Estudio de la respuesta bioquímica a un estímulo mecánico local

Como se mencionó anteriormente, se busca estudiar la influencia de un estímulo mecánico específico sobre la dinámica de algunas proteínas de las adhesiones focales. Con este objetivo se diseñó y realizó el experimento que se detalla a continuación, explotando las capacidades combinadas del microscopio presentado en el capítulo 2.

3.4.1. Descripción del experimento

El experimento propuesto consiste en ejercer una fuerza localizada y cuantitativamente controlada sobre una célula viva, para desencadenar la formación de la adhesión focal y seguir en función del tiempo la respuesta bioquímica mediante la visualización y localización de proteínas que componen las adhesiones focales fusionadas a VFPs. La fuerza mecánica se aplica con la punta del AFM mientras la respuesta dinámica de las proteínas se estudia con epifluorescencia. El protocolo de cultivo y transfección de las células, realizado por Catalina von Bildering fue presentado en detalle en su tesis doctoral [von Bildering, 2013]: se trabajó con células epiteliales de glándula mamaria de ratón, conocidas como la línea celular HC11.

Un importante antecedente para este estudio es trabajo del grupo del Prof. M. Sheetz [Galbraith *et al.*, 2002], donde estudió la formación de FAs en fibroblastos utilizando microesferas funcionalizadas con fibronectina para ejercer estímulos mecánicos específicos y epifluorescencia para monitorear la proteína vinculina unida a la GFP. Se mostró que la formación de pequeños complejos focales en los alrededores de las microesferas es específica (responde solo a la fibronectina), que depende del área de las esferas y de la fuerza aplicada (se utilizaron pinzas ópticas para ejercer fuerzas). Además se reportó un tiempo de reclutamiento de decenas de segundos para la vinculina.

Con el fin de aumentar la superficie de contacto para la interacción punta de AFM-célula se limaron puntas comerciales de nitruro de silicio (NPSTT *twin tips*, fabricadas por Bruker). El protocolo de limado consiste en hacer barrer la punta con el AFM en modo contacto (trabajando en agua MiliQ) sobre un sustrato de vidrio durante media hora en un área de $1 \times 1 \mu\text{m}$, a alta velocidad (60 líneas por segundo) con la máxima fuerza aceptada por la electrónica. En la figura 3.3 (a) se muestra una imagen SEM de la punta después del proceso de limado y en (b) un detalle de la misma, donde puede notarse que el área final es $\sim 0,2 \mu\text{m}^2$. Una vez limada la punta se comienza el proceso de funcionalización con fibronectina, para lo cual es necesario recubrirla con oro y luego incubarla durante una hora a temperatura ambiente en una solución de 100 mM de fibronectina (Sigma) en PBS, como se esquematiza en la figura 3.3 (c).

Como se desean medir las fuerzas aplicadas con el sensor de fuerza, es necesario conocer la constante elástica del mismo. Para medirla se utilizó el procedimiento basado en las oscilaciones térmicas, presentado en el capítulo 2, sección 2.7.1, antes de funcionalizar el sensor con Fn (el agregado de la proteína no cambia la constante elástica).

Una vez preparada la muestra con células expresando la proteína quimera proteína-EGFP y modificado el sensor de fuerza, se puede comenzar con el experimento. Notar que el experimento se realiza en medio de cultivo, lo que asegura que las células permanezcan

3.4. Estudio de la respuesta bioquímica a un estímulo mecánico local

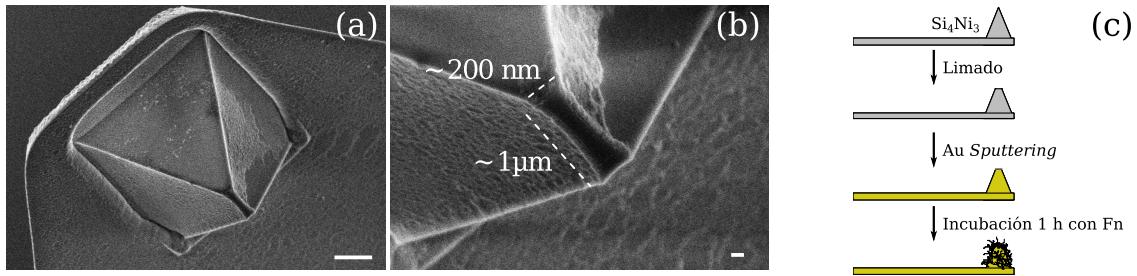


Figura 3.3: Preparación del sensor de fuerza: limado y funcionalización. (a) Imagen SEM del sensor de fuerza luego del proceso de limado. (b) Detalle de la punta, donde se puede ver el área de contacto aumentada a $\sim 0,2 \mu\text{m}^2$. (c) Esquema del proceso de funcionalización: luego del limado se recubre con oro la muestra (con la técnica *sputtering*) y luego se incuba con una solución de Fn durante una hora a temperatura ambiente. Figura modificada de [von Bildering, 2013].

vivas y funcionales durante todo el tiempo del experimento. Se ubica una célula que exprese la proteína entre todas las presentes en la muestra (la eficiencia de transfección es $< 10\%$) y se posiciona el sensor de fuerza sobre ella, realizando la mínima fuerza posible ($< 1 \text{nN}$), monitoreando la posición en el modo transmisión. Para verificar la correcta ubicación sobre la zona blanda de la célula se realiza un ciclo de fuerza que exhibirá la forma particular de una muestra blanda [Radmacher, 2002].

En la figura 3.4 se muestra esquemáticamente la dinámica del experimento, que comienza cuando se aplica una fuerza predefinida, F_{aplicada} , sobre la célula. En ese momento, que se define como $t = 0$, se empiezan a adquirir imágenes de fluorescencia, que servirán para monitorear los cambios espaciotemporales de la proteína en estudio. Los datos de salida del experimento consisten en una serie temporal de imágenes (un video) de fluorescencia junto con el valor de fuerza aplicada sobre la célula. Todas las imágenes fueron tomadas utilizando un objetivo 40x ($NA = 0,75$, Carl Zeiss) y con la cámara CCD en su máxima resolución espacial, con un tiempo de integración de 1 a 5 segundos, dependiendo de la intensidad de la proteína utilizada. Se estudiaron tres proteínas de adhesiones focales: vinculina, FAK y zixina.

Análisis de los datos

Una vez adquirido el video de fluorescencia, que es una serie de valores de intensidad bidimensional para cada tiempo $I(x, y, t)$, se busca realizar un análisis de la evolución de la intensidad en distintas zonas de la muestra. Para eso se seleccionan regiones de interés (ROIs) con forma elíptica sobre cada una de las adhesiones focales presentes en la primer imagen de la secuencia. Dado que el estímulo mecánico efectuado por el AFM es local, se espera que la intensidad proveniente de una adhesión focal madura lejana a la punta no se vea afectada por el estímulo mecánico, por lo que se la considera como una FA de control.

Hay dos correcciones importantes que deben ser realizadas a cada imagen del video antes de analizarlo para sacar conclusiones. La primera es el fondo, es decir, el valor de señal en la imagen donde no hay proteínas fluorescentes, y el segundo es el fotoblanqueo. Como se mostró en el capítulo 2, en las imágenes tomadas en modo combinado se tiene

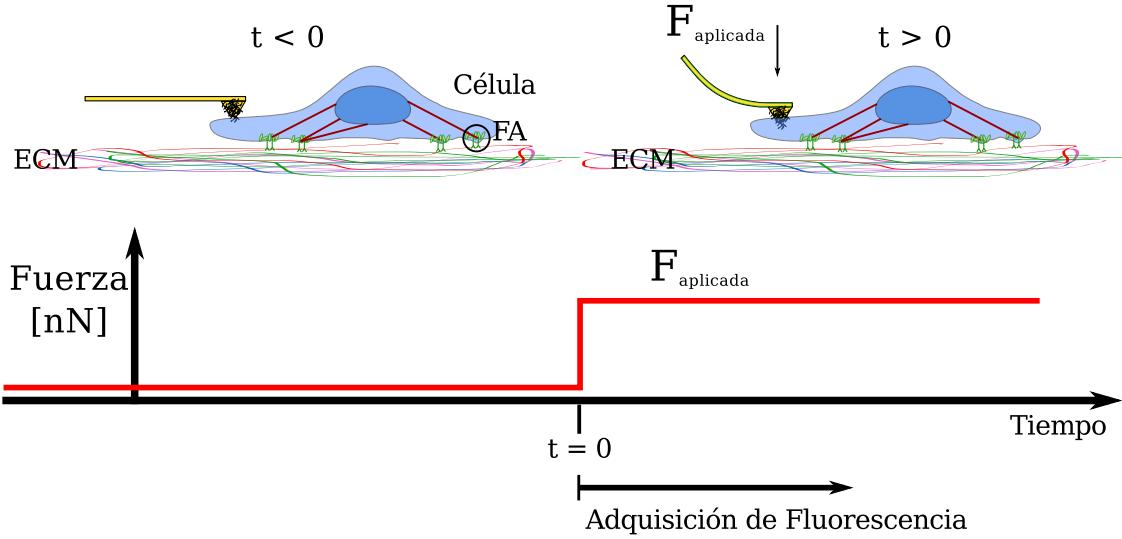


Figura 3.4: Esquema experimental del ensayo para el estudio mecanotransducción. Antes de comenzar el experimento se ubica la punta de AFM en la periferia de la célula, donde no hay una adhesión focal madura (FA), aplicando una mínima fuerza para establecer contacto. Luego, a $t = 0$ se une una determinada fuerza, $F_{aplicada}$ y se comienzan a tomar imágenes de fluorescencia.

una sombra debajo del *cantilever*, lo que significa que el fondo en esa zona es distinto al fondo en los otros lugares de la muestra. Se selecciona una zona elíptica centrada en cada adhesión focal como región de interés (ROI) y luego se calculó el promedio de la intensidad en cada una, $I_{ROI}(t)$. A esta intensidad media se le resta el valor de fondo correspondiente, según en qué zona se encuentra (debajo de la sombra del *cantilever* o no).

Luego se debe corregir el efecto del fotoblanqueo ($FB(t)$), para lo cual se utiliza la el promedio de las intensidades de las FA control:

$$FB(t) = \frac{1}{N} \sum_{ROI=1}^N I_{ROI}(t) - bg(t), \quad (3.1)$$

donde N es el número total de ROIs control en la imagen y $bg(t)$ es el fondo correspondiente (depnde de la zona donde se encuentra la ROI). Por lo tanto, la intensidad corregida se obtiene normalizando por esta curva $I_{ROI}^{nor}(t) = I_{ROI}(t)/FB(t)$. Por último, se calcula la la intensidad final $I_f(t)$, que se referencia al valor en la primer imagen de la secuencia, a $t = 0$, donde los efectos de la fuerza todavía no han inducido cambios en el sistema segün

$$I_f(t) = \frac{I_{ROI}^{nor}(t)}{I_{ROI}^{nor}(0)} - 1, \quad (3.2)$$

donde se resta la unidad para que todas las curvas comiencen en una intensidad nula.

Con todos estos elementos presentados se pasa ahora a discutir los resultados obtenidos para cada proteína estudiada: vinculina, FAK y zixina.

3.4. Estudio de la respuesta bioquímica a un estímulo mecánico local

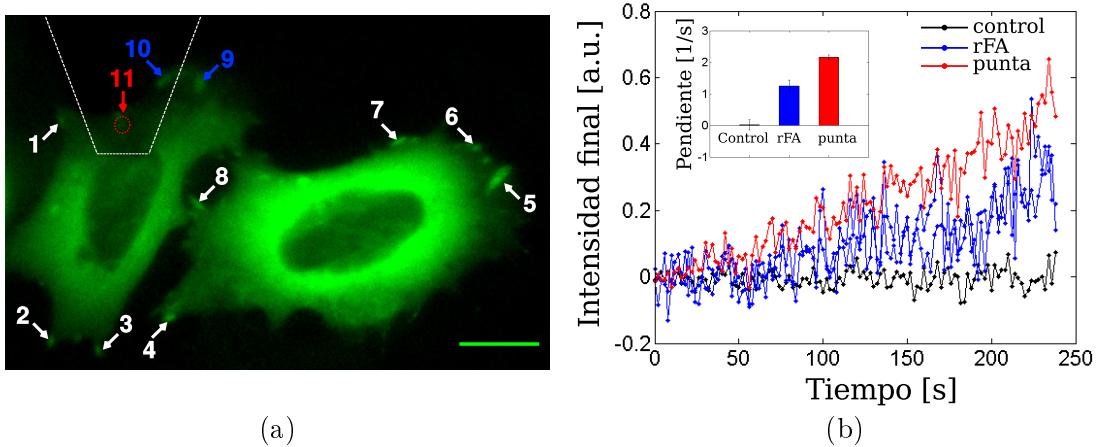


Figura 3.5: Evolución temporal para la vinculina. (a) Primer imagen de fluorescencia del video de vinculina, donde se marca la zona donde se encuentra el *cantilever* con líneas punteadas. Con flechas se numeran las distintas adhesiones focales: las blancas representan las utilizadas como control, las azules son las más cercanas a la punta y la roja indica la zona donde la punta está haciendo presión. (b) Evolución temporal de la intensidad para tres ROIs, donde puede verse claramente el aumento de intensidad debajo de la punta. En el recuadro pequeño se muestran las pendientes obtenidas para el ajuste lineal de cada curva.

3.4.2. Reclutamiento de vinculina y formación de una adhesión focal

Se estudió la evolución de la intensidad de EFGP-vinculina (la E extra viene de *enhanced*) en distintas FAs cuando se aplica una fuerza de (66 ± 6) nN sobre una célula HC11, con la punta de AFM limada y recubierta de fibronectina, como se describiera en la sección 3.4.1.

La figura 3.5 (a) muestra la primer imagen de la secuencia 250 s de duración, donde se ven dos células transfectadas; una de ellas es estimulada mecánicamente en la zona donde se marca el *cantilever*. Para el análisis se seleccionaron ROIs numeradas desde 1 hasta 11 en la figura, que incluyen las FAs consideradas control (marcadas en blanco), las que están cercanas a la punta (marcadas en azul) y una justo debajo de la punta (marcada en rojo). Se realizaron las correcciones mencionadas en la sección anterior para cada ROI. De ahora en más se nombrará la intensidad final (luego de todas las correcciones) como intensidad a secas para simplificar.

Se estudió en detalle la evolución de la intensidad fluorescencia para tres ROIs representativas: una del grupo de control, la número 10 y la 11, que se ubica justo debajo de la punta. La evolución temporal de la intensidad para estas zonas se muestra en la figura 3.5 (b), donde se ve claramente que la intensidad en la FA control se mantiene constante mientras que en las zonas 10 y 11 (curva azul) la intensidad aumenta notablemente. Esto muestra que la proteína vinculina está siendo reclutada fuertemente debajo de la punta y en menor medida en adhesiones maduras cercanas al estímulo mecánico. Para cuantificar este comportamiento, se ajustaron rectas a cada curva, cuyas pendientes se muestran en el recuadro pequeño de la figura y muestran una notable correlación espacial: la mayor pendiente se obtiene debajo de la punta y la siguiente en orden decreciente corresponde a

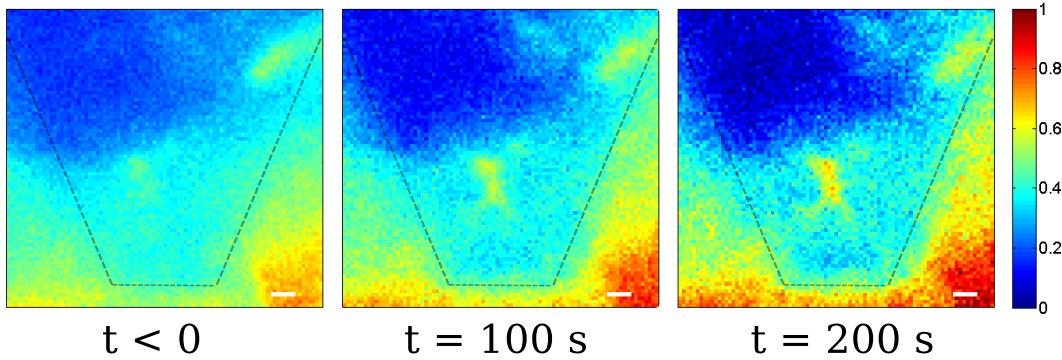


Figura 3.6: Observación de la formación de una FA naciente con vinculina. Detalle de la zona debajo de la alrededor de la punta de la figura 3.5 (a), para distintos tiempos en el experimento. El mapa de colores muestra la intensidad final y se muestra en línea punteada la posición del *cantilever*. Se puede observar el reclutamiento de vinculina justo debajo de la punta. Barra de escala: 10 μm .

las adhesiones cercanas a la zona estimulada, mientras que las pendientes nulas se obtienen para los sitios focales en las periferias.

El reclutamiento de proteína debajo de la punta resulta también evidente si se analizan las imágenes de esa zona en particular a distintos tiempos del experimento. En la figura 3.6 se muestran mapas de intensidad de la zona estimulada directamente por la punta. En la imagen a $t < 0$ s se observa una distribución de proteína aproximadamente uniforme debajo e la punta, mientras que a $t = 100$ s se observa que la proteína está siendo reclutada. Finalmente, para $t = 200$ s se observa más notoriamente el aumento de intensidad y se puede ver que la forma que toma la FA naciente coincide con la de la punta de AFM de la figura 3.3. Notar también que en la parte superior derecha de la figura se observa la FA etiquetada con el número 10, que también muestra un aumento en la intensidad, pero con menor tasa que debajo de la punta.

Estos resultados en conjunto muestran que una fuerza externa local aplicada por una sonda de AFM funcionalizada puede disparar el reclutamiento de vinculina en adhesiones focales maduras y también el desarrollo de una adhesión focal naciente.

3.4.3. Estudio de la quinasa de adhesión focal (FAK)

Se estudiaron células HC11 expresando el complejo EGFP-FAK con la misma metodología presentada. Se aplicó un esfuerzo constante de (37 ± 9) nN durante 1200 s mientras se tomaban imágenes de fluorescencia. Nuevamente se realizan las correcciones de fondo y fotoblanqueo correspondientes para tener las intensidades finales en cada zona de la muestra.

En la figura 3.7 se muestran imágenes representativas de la secuencia obtenida, con especial énfasis en una zona seleccionada debajo del ápice de la punta. Las imágenes de pseudocolor de la figura 3.7 (b)-(d) revelan los cambios en intensidad inducidos por la fuerza aplicada. Se destacan dos regiones con las flechas 1 y 2, donde se observan los cambios más notorios. En la zona 1 ocurre una concentración espacial local de la proteína. La evolución

3.4. Estudio de la respuesta bioquímica a un estímulo mecánico local

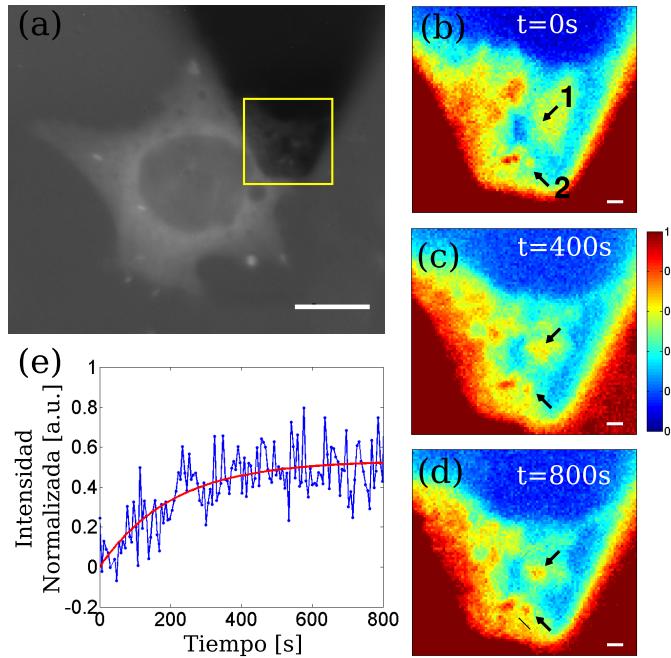


Figura 3.7: Reclutamiento de FAK: observación del tiempo característico. (a) Imagen de fluorescencia de una célula HC11 expresando el complejo EGFP-FAK. Barra de escala: 10 μm . (b)-(d) Imágenes pseudocoloreadas de una zona seleccionada debajo de la punta de AFM en (a), para distintos tiempos en el experimento, indicados en cada imagen. Se remarcán con una flecha dos zonas donde se observa reclutamiento de la proteína. Barra de escala: 1 μm . (e) Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia en la zona 1, considerando una ROI coincidente con el tamaño en (d). El ajuste exponencial arrojó un tiempo característico de (200 ± 80) s.

temporal de la intensidad en esta zona se grafica en la figura 3.7 (e), donde se observa un crecimiento exponencial con un tiempo característico de (200 ± 80) s¹. Por otro lado, en la zona 2 se observa un aumento de la intensidad sin remodelado espacial.

Tanto la vinculina como la FAK son proteínas de adhesión que han sido identificadas como elementos mecano-regulatorios importantes, con funciones de mecanotransducción similares [Mierke, 2013]. Con los resultados presentados hasta aquí se muestra que ambas son sensibles a un estímulo mecánico externo.

3.4.4. Remodelado de la distribución espacial de la proteína zixina para distintas fuerzas

La zixina es una proteína que se observa en las adhesiones focales maduras y está ausente en las adhesiones nacientes. Por lo tanto, en las escalas de los experimentos presentados aquí no se espera un reclutamiento de zixina en el ápice de la punta de AFM funcionalizada. Sin embargo, se observaron cambios en la intensidad de fluorescencia y la distribución espacial (remodelado) de esta proteína en adhesiones focales maduras en la interfase célula sustrato, como se muestra a continuación.

¹Para esto se tomo una ROI que coincide con el tamaño final del cúmulo que se observa en la figura 3.7 (d) y se realizó un ajuste exponencial de la intensidad vs. el tiempo.

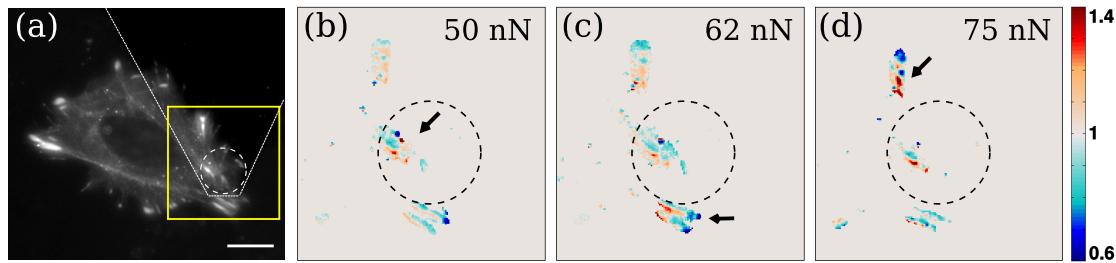


Figura 3.8: Remodelado espacial de zixinina. (a) Imagen de fluorescencia de una célula HC11 expresando el complejo EGFP-zixinina. Barra de escala : $10 \mu\text{m}$. (b)-(d) Imágenes de I_r , definida como el cociente de la imagen al final de un segmento (con fuerza constante) con la imagen al inicio para la zona recuadrada en amarillo en (a). En cada imagen se indica el valor de fuerza utilizado y las flechas apuntan a las zonas donde se observa mayor dinámica. En estos mapas, las zonas grises, rojas y azules indican que la concentración local de proteína se mantuvo constante, aumentó o disminuyó, respectivamente.

Para el estudio de esta proteína se cambió levemente el esquema de trabajo. En lugar de ejercer una fuerza constante, se ejercen tres fuerzas distintas de manera sucesiva, durante 250 s cada una. Para ello se fija un lugar sobre una célula donde existen adhesiones focales maduras. Con el objetivo de estudiar el efecto de cada segmento de fuerza por separado se tomaron las primeras veinte imágenes de cada tramo y las últimas veinte y se promediaron (todas corregidas por el fondo y el fotoblanqueo). Luego se dividieron las imágenes promediadas para construir una imagen $I_r(x, y) \equiv I_{final}(x, y)/I_{inicial}(x, y)$, que pone en evidencia los cambios sufridos en cada etapa: las zonas donde $I_r > 1$ indican reclutamiento de proteína; en las zonas donde $I_r < 1$ la proteína se retira mientras que donde $I_r = 1$ no hay cambios.

En la figura 3.8 (a) se muestra una imagen de fluorescencia de una célula HC11 expresando el complejo EGFP-zixinina, donde la posición del *cantilever* se indica con una línea punteada. Se toma como región de interés la zona recuadrada en amarillo, centrada en la punta de AFM y se calculan las imágenes I_r para cada fuerza. Las imágenes obtenidas de esta zona se presentan en las figuras 3.8 (b)-(d), una para cada fuerza utilizada. En estos mapas se pueden observar tres grupos de adhesiones focales, una debajo de la punta (en el centro del círculo) una más abajo y otra arriba del círculo.

Para el primer valor de fuerza aplicada, $(50 \pm 8) \text{ nN}$, se observa que las tres adhesiones focales muestran cambios: en los tres casos hay zonas dentro de la adhesión que reclutan proteína (puntos rojos) y otras que la dejan ir (puntos azules). Notablemente, la adhesión que presenta mayor cambio es la que se encuentra debajo de la punta. Luego, al aumentar la fuerza al valor de $(62 \pm 8) \text{ nN}$, se obtiene el mapa de la figura 3.8 (c). Se mantienen los puntos rojos y azules mencionados anteriormente pero ahora los puntos de mayor cambio se ubican en el segundo grupo de adhesiones (remarcado con una flecha). Finalmente la figura 3.8 (d) muestra la imagen I_r obtenida para $(75 \pm 9) \text{ nN}$. En este caso la región con cambios más pronunciados se encuentra en el grupo de adhesiones más alejado de la punta.

Esto muestra que el remodelado de zixinina dentro de una misma adhesión focal depende de la fuerza aplicada y que se extiende hacia adhesiones más alejadas del estímulo al aumentar la fuerza aplicada.

3.5. Conclusiones

Se presentó un método que combina AFM con epifluorescencia para estudiar la dinámica de proteínas de adhesión a nivel de sitios focales individuales, en respuesta a estímulos mecánicos específicos, controlados y locales. Con esta técnica se estudió la evolución de las proteínas vinculina, FAK y zixina en tiempo real por efecto de fuerzas en el rango de los nN aplicadas en células HC11. En el caso de vinculina y FAK se observa la formación de un sitio focal naciente alrededor de la punta de AFM funcionalizada y se obtuvo un tiempo característico de (200 ± 80) s para el reclutamiento de FAK.

También se observó una reorganización (acumulación o pérdida) en la distribución espacial de la proteína zixina dentro de las adhesiones focales maduras en respuesta a distintos valores de fuerza. Además, se observó que al aumentar la fuerza aplicada el mencionado remodelado se extiende, alejándose de la zona donde se aplica la fuerza. Estos resultados evidencian la conexión entre la fuerza aplicada en la célula y la dinámica de proteínas en las adhesiones focales.

Capítulo 4

Microscopía confocal de doble haz

Un microscopio confocal de barrido de doble haz fue diseñado y construido en la misma plataforma del microscopio combinado. El diseño permite estudiar las muestras con dos haces simultáneamente y permite detectar fluorescencia y *scattering* por separado o simultáneamente. Es importante notar que el diseño final que se presenta a continuación permite utilizar todas las técnicas presentadas en capítulos anteriores: se puede alternar entre el uso del microscopio confocal y el *wide field* de manera sencilla y práctica. Se presentan los principios fundamentales de la microscopía confocal y la caracterización del funcionamiento del microscopio construido.

4.1. Introducción y motivaciones

El concepto básico de la detección confocal fue presentado por Marvin Minsky a mediados de la década de 1950, aunque la idea no generó demasiada respuesta en la comunidad científica hasta 1969, cuando se implementó exitosamente utilizando un láser como fuente de luz y una plataforma móvil para mover el objetivo y así barrer el haz de excitación sobre la muestra [Davidovits y Egger, 1969]. En 1973 se reportó la primer imagen en células endoteliales de la córnea utilizando esa configuración [Davidovits y Egger, 1973]. Luego, 1980 Sheppard y Wilson presentaron una teoría completa de la formación de imágenes utilizando detección confocal [Sheppard y Wilson, 1980]. En los años siguientes diversos grupos de investigación contribuyeron a mejorar el diseño de los microscopios confocales, aumentando la velocidad de barrido, la resolución y la calidad de las imágenes. En 1987 se comenzaron a comercializar los microscopios confocales, que durante la década de 1990 se volvieron una herramienta altamente utilizada, gracias a los avances en la tecnología de almacenamiento y procesamiento de datos, la aparición de métodos de barrido altamente eficientes y la utilización de láseres más estables y confiables [Rai y Dey, 2011].

Actualmente se puede considerar a los microscopios confocales como una plataforma mecanoelectrónica completamente integrada, que permite el estudio de muestras gruesas realizando un seccionamiento óptico de manera no invasiva, con sensibilidad que alcanza la detección de moléculas únicas [Kulzer y Orrit, 2004; Peterman *et al.*, 2004], por lo que se ha transformado en una herramienta de rutina en diversas áreas de la ciencia.

Existen un gran número de técnicas que se implementan en plataformas confocales y que utilizan la fluorescencia como mecanismo de contraste para obtener información de la muestra. Dos ejemplos son la espectroscopía de correlación de fluorescencia (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*, FCS) y la llamada microscopía de tiempo de vida (*Fluorescence Lifetime Microscopy*, FLIM). FCS se basa en estudiar fluctuaciones espontáneas de intensidad de fluorescencia en un punto de la muestra para obtener información sobre la concentración de una especie en el rango nanomolar o la constante de disociación de una interacción molecular [Schwille y Haustein, 2001; Medina y Schwille, 2002], solo por mencionar algunas de sus aplicaciones. Por su parte, FLIM es una técnica de imagen que en lugar de construir un mapa bidimensional de intensidad de fluorescencia construye un mapa de tiempo de vida, donde en cada punto de la imagen se muestra el tiempo de vida de fluorescencia medido [Lakowicz *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 2004]. Esta técnica se utiliza ampliamente para el estudio de interacciones moleculares (utilizando el mecanismo de transferencia de energía resonante, FRET) [Jares-Erijman y Jovin, 2006; Wallrabe y Perriam, 2005] y para revelar procesos bioquímicos dentro de la célula [Bastiaens y Squire, 1999].

En la presente tesis se utiliza la configuración de doble haz para dos aplicaciones específicas que requieren por un lado medir fluorescencia, pero a la vez excitar la muestra en el infrarrojo cercano (NIR) para inducir cambios de temperatura por calentamiento plasmónico, como se presentará en detalle en el capítulo 5. Esta configuración de doble haz se utiliza en otras aplicaciones por diversos motivos. Por ejemplo, si se desea estudiar *scattering Raman estimulado* (*Stimulated Raman Scattering*, SRS) u otra técnica similar como CARS¹ es necesario tener dos pulsos de excitación que sean superpuestos espacial y temporalmente [Min *et al.*, 2011; Alfonso-García *et al.*, 2014].

¹Se discute más detalladamente esta técnica en el capítulo 6.

4.2. Principios de funcionamiento de la microscopía confocal

Otra técnica que utiliza dos láseres superpuestos es la llamada *pump-probe* (PP), que consiste en bombar una muestra con un pulso ultracorto (*pump*) y cierto tiempo después incidir con otro pulso ultracorto, llamado el pulso de prueba (*probe*) que sirve para medir el estado de la muestra a tiempo en ese instante. Modificando la distancia temporal entre estos dos pulsos se puede obtener información resuelta en el tiempo en la escala de los pico a los nanosegundos. Esta técnica también puede implementarse en un microscopio confocal para realizar imágenes resueltas en el tiempo, para lo que se necesita una configuración de doble haz, pues es necesario excitar y observar la muestra en el mismo punto [Cabanillas-Gonzalez *et al.*, 2011; Grumstrup *et al.*, 2014].

Por último es importante remarcar que todas las técnicas mencionadas de microscopía óptica confocal pueden ser implementadas trabajando en condiciones fisiológicas, lo que permite trabajar con células vivas y estudiar así procesos dinámicos biológicamente relevantes. Esta es una de las principales razones por las que la microscopía óptica y en particular la microscopía confocal ha revolucionado el área de las ciencias de la vida.

4.2. Principios de funcionamiento de la microscopía confocal

Un microscopio ideal sería un instrumento capaz de examinar alguna interacción física entre la luz incidente y un único punto de la muestra. Realizar esto en cada punto² de la muestra llevaría a una reconstrucción “perfecta” de la imagen pues la señal colectada proviene únicamente de cada punto examinado. Sin embargo, al iluminar la muestra de manera amplia, muchos puntos de la muestra reciben luz y por lo tanto en lugar de estar examinando un solo punto se examinan varios.

En 1957 Marvin Minsky tuvo una idea simple y elegante para lograr examinar un único punto de la muestra por vez, que se conoce como la configuración confocal (luego fue patentada [Minsky, 1961]). Minsky notó que se puede iluminar solo un punto de la muestra colocando una abertura o *pinhole* entre la fuente de luz y la lente que enfoca la luz en la muestra, como se esquematiza en la figura 4.1 (a). Como consecuencia la cantidad de luz que recibe la muestra se reduce en varios órdenes de magnitud sin reducir el brillo de la fuente de luz. Aún con esta modificación, cuando se trata de muestras gruesas, como es el caso de las células, varios puntos en la misma posición lateral pero distinta ubicación axial son iluminados simultáneamente y los rayos provenientes de estos puntos pueden llegar al detector. Para solucionar esto se agrega un segundo *pinhole* después de la lente de colección, cuya función es bloquear los rayos que vienen de planos fuera de foco (líneas punteadas en la figura 4.1). Con esto queda claro el término confocal: se refiere a que las dos aberturas se enfocan en el mismo punto del objeto.

Minsky también consideró la configuración que se muestra en 4.1 (b), donde en lugar de utilizar dos lentes, una para enfocar la luz y otra para detectar, se utiliza un divisor de haz y una única lente que simultáneamente enfoca la luz de excitación y coleta la luz proveniente de la muestra. Esta configuración simplifica notablemente el procedimiento de alineación y es la más utilizada en la actualidad.

²Cuando se dice “punto” se refiere a un *spot* limitado por difracción, no a un punto en el sentido matemático.

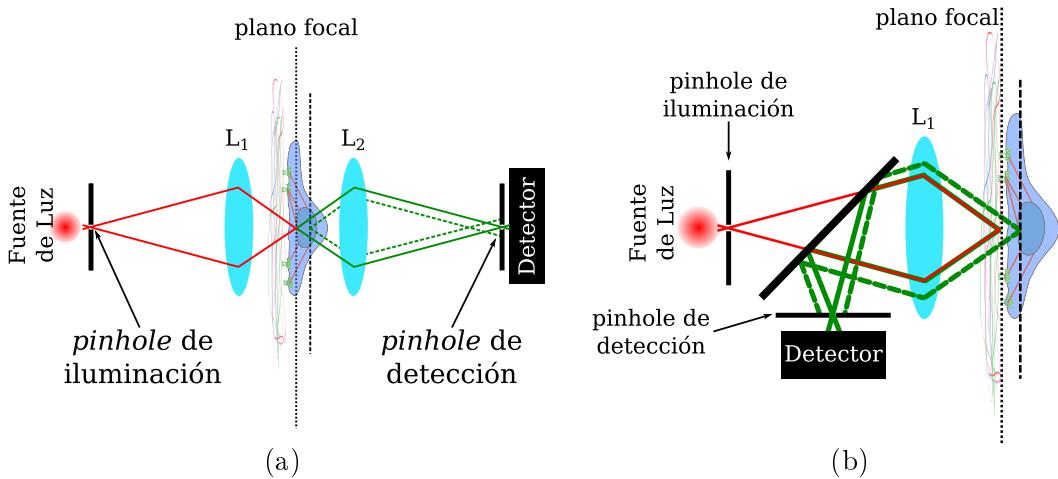


Figura 4.1: Esquema del principio confocal. (a) Configuración confocal con dos lentes, una para enfocar la luz de excitación y otra para colectar la emisión. (b) Configuración con una única lente y un divisor de haz. En ambos casos se muestra el camino de los rayos que llegan y salen del plano focal y rayos que vienen de un plano distinto, para evidenciar que estos no llegan al detector. Basado en los dibujos originales de la patente de Minsky [Minsky, 1961].

La microscopía confocal ofrece numerosas ventajas respecto de la microscopía *wide field* como por ejemplo la posibilidad de controlar la profundidad de campo y la reducción de la señal proveniente de planos distintos al plano focal, hecho que genera imágenes más nítidas, con mayor contraste y permite realizar un seccionado óptico en la dirección axial para muestras gruesas. Luego, con estas secciones ópticas se puede realizar una reconstrucción tridimensional de la muestra en estudio.

La llamada *Point Spread Function* (PSF) es una medida del poder de resolución de un sistema óptico: cuanto más angosta sea esta función mayor será la resolución del sistema Novotny y Hecht [2012]. Como su nombre lo indica, esta función representa cómo se dispersa la luz que proviene de una fuente puntual al propagarse por un sistema óptico; en otras palabras, es la respuesta al impulso (en coordenadas espaciales) del sistema. El hecho que una fuente puntual genere una imagen de ancho finito es una consecuencia directa del filtrado espacial que sufre la luz al atravesar el sistema, pues no todos los vectores de onda generados por la fuente puntual (que tiene espectro infinito de frecuencias espaciales) son colectados y transmitidos por el sistema óptico. Por lo tanto, se obtendrá una imagen borrosa de esta fuente puntual, que es la PSF.

En el caso del microscopio confocal, la PSF se obtiene como el producto de la PSF de excitación y de la de detección [Sheppard y Wilson, 1980], que son las imágenes de los *pinholes* de iluminación y detección a través del sistema óptico. La forma funcional de cada PSF es una función a Airy y al elevar esta función al cuadrado se reduce el lóbulo principal un factor 1.3, lo que mejora mínimamente la resolución lateral [Webb, 1996]. Sin embargo, la gran ganancia obtenida al utilizar este sistema de detección e iluminación localizadas se da en la dirección axial, donde se reduce el tamaño de la PSF milimétrica a micrométrica.

4.3. Descripción del microscopio confocal de doble haz

En la figura 4.2 se muestra un esquema del microscopio confocal invertido construido, con los componentes principales utilizados, que se describirá en detalle en esta sección. El diseño busca adicionar a las técnicas ya presentadas de AFM y *wide field* un microscopio confocal de doble haz, es decir, que permite excitar simultáneamente la muestra con dos láseres. En cuanto a la detección, se busca tener la posibilidad de realizar imágenes de *scattering* (con ambos láseres), de fluorescencia y además medir espectros de emisión con resolución espacial.

Se utilizó como punto de partida la plataforma del microscopio combinado AFM-óptico presentado en el capítulo 2, manteniendo las capacidades tanto del AFM como del microscopio *wide field*. Para lograr este cometido se utilizan dos cubos rebatibles, uno que contiene el espejo dicroico, los filtros de excitación y de emisión para detectar fluorescencia *wide field* (se puede reemplazar por otro cubo con cualquier juego de filtros) y otro que contiene un espejo que desvía la luz que viene de la muestra hacia la CCD (ver figura 4.2). En la configuración confocal se remueven estos dos cubos para dejar pasar los láseres de excitación mientras que para trabajar en *wide field* deben ser colocados. Es importante notar que para trabajar en la configuración confocal muchas veces es necesario realizar una inspección de la muestra en el modo *wide field*, ya sea en transmisión o en fluorescencia, por lo que resulta fundamental desde el punto de vista práctico la facilidad para alternar entre las técnicas.

La configuración confocal de doble haz consiste en dos láseres totalmente superpuestos en el plano de la muestra, uno en el rango visible y el otro en el rango infrarrojo cercano (NIR). Para obtener una imagen confocal se barre la muestra con la platina piezoelectrica de tres ejes y sus respectivos controladores, dejando el haz y el objetivo de microscopio de alta apertura numérica (40x, $NA = 0,9$ UPLANSAPO, Olympus) fijos. Se utiliza un programa de barrido llamado *Inspector*, que fue desarrollado en el Instituto Max Planck de Química Biofísica [Schonle, 2006], para controlar todo el microscopio (en el modo confocal) a través de la PC. Cabe notar que la configuración experimental alcanzada es realmente flexible para la implementación de diversas técnicas, dependiendo de la aplicación concreta que se desea estudiar. Se pueden utilizar distintos modos de iluminación, distintas longitudes de onda de excitación y diferentes modos de colección, como se mostrará en capítulos siguientes.

A continuación se detallarán las características particulares de cada componente así como su función dentro del microscopio. En primer lugar se describen las fuentes de luz disponibles y cómo son utilizadas para la iluminación. En segundo lugar se presenta la metodología para superponer los haces y finalmente se describen los distintos esquemas para la detección.

4.3.1. Iluminación confocal y fuentes de luz

El microscopio consta de un láser de estado sólido bombeado por diodos (Compass 315M, Coherent), que provee de $\sim 70\text{ mW}$ de luz en $\lambda = 532\text{ nm}$ con polarización lineal. El mismo cuenta con un sistema de control de temperatura para mantener constante la intensidad de salida (se observan variaciones del < 10 % en escalas de tiempo de veinte minutos). El láser es acoplado en una fibra monomodo (P3-488-PM-FC-2, Thorlabs) con un

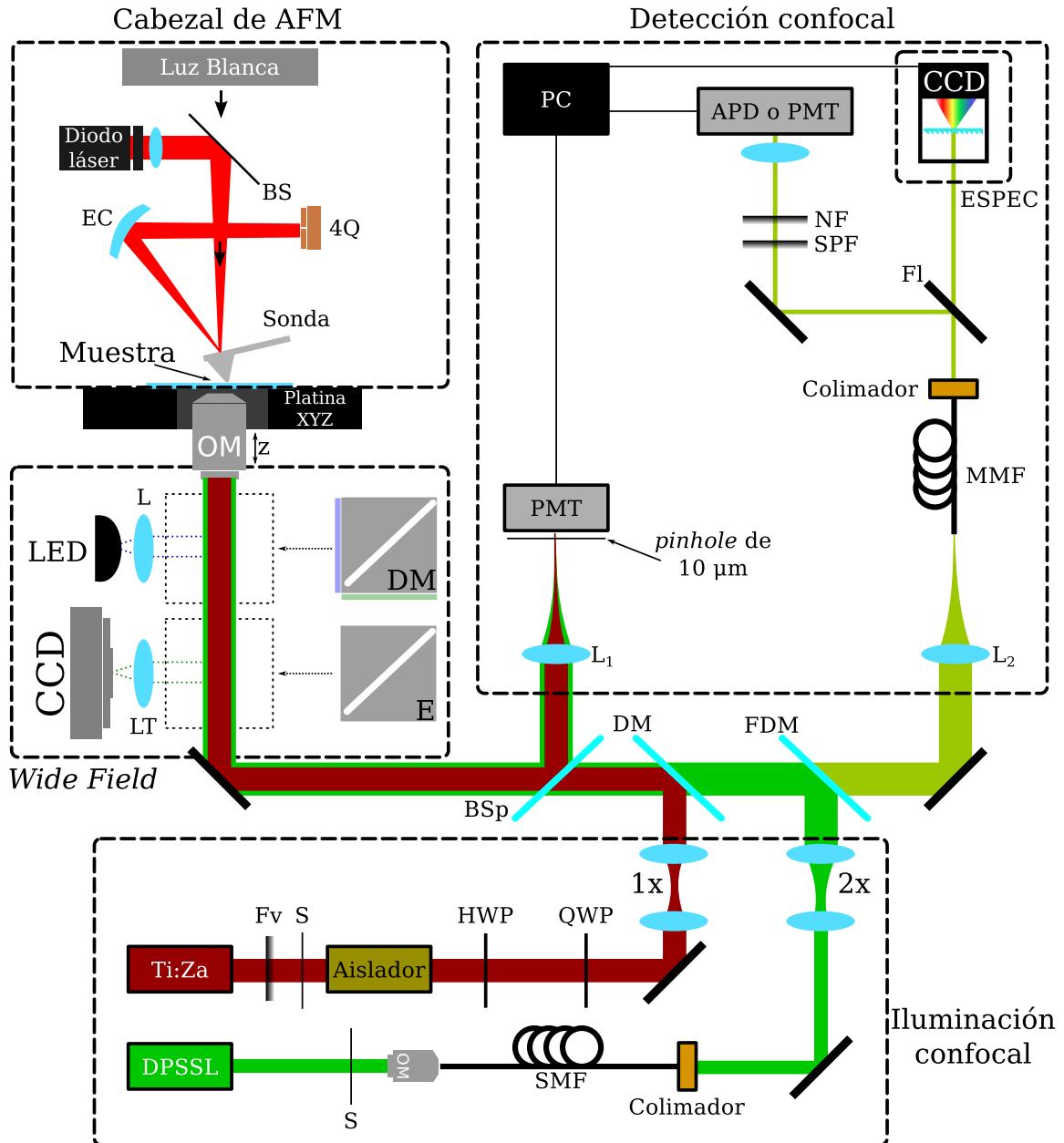


Figura 4.2: Dispositivo experimental del microscopio confocal *home-made*. Cuatro bloques principales se combinan en una configuración multipropósito: AFM, *wide field*, iluminación y detección confocal. Los dos primeros fueron descriptos en detalle en el capítulo 2. Los componentes agregados para este modo se mencionan a continuación. Ti:Za: Láser de Titano Zafiro. DPSSL: láser de estado sólido bombeado por diodos. S: *shutter* mecánico. Fv: filtro neutro variable. Aislador: aislador óptico. HWP: lámina de media onda. QWP: lámina de cuarto de onda. OM: objetivo de microscopio. SMF: fibra óptica monomodo. 1x, 2x: telescopios. FDM: espejo dicroico de fluorescencia. DM: espejo dicroico. BSp: película divisora de haz. L_1, L_2 : dobletes acromáticos. MMF: fibra óptica multimodo. Fl: espejo rebatible (*flipper*). SPF: filtro pasa bajos. NF: filtro *notch* para $\lambda = 532$ nm. PMT: fotomultiplicador. APD: photodiodo de avalancha.

4.3. Descripción del microscopio confocal de doble haz

objetivo de microscopio 40x ($NA = 0,6$, Carl Zeiss) que permite tener un modo gausiano perfecto a la salida y evita cambios en la alineación por cambios de puntería. Se utiliza un colimador (modelo 60FC-4-A11-01, Schaffer and Kirchoff) y luego un telescopio 2x (formado por dos dobletes acromáticos) para obtener un haz colimado de tamaño similar de la pupila de entrada del objetivo (diámetro pupila $\approx 8\text{ mm}$). Este láser se utiliza para la excitación de fluorescencia, por lo que se refleja en un espejo dicroico de fluorescencia (FDM en la figura 4.2, Di02-R532-25x36, Semrock) que a su vez transmite la emisión de fluorescencia para su detección. Un bloqueador o *shutter* mecánico se utiliza para controlar los intervalos en los que el láser llega a la muestra y prevenir el fotoblanqueo innecesario.

El haz infrarrojo proviene de un láser de Titanio Zafiro sintonizable (Ti:Za, Modelo MTS, fabricado por KMLabs) que puede ser utilizado en modo continuo (CW) o modo pulsado (ML). En el primer caso el rango de sintonización es amplio³, entre 720 y 890 nm, y para el caso ML el rango va desde 760 a 840 nm. En la configuración pulsada se tiene una frecuencia de repetición de 94 MHz y un ancho de pulso típico de 50 fs. La potencia de este láser se controla con un filtro neutro variable (Fv en la figura 4.2, modelo NDM4/M, Thorlabs) y un *shutter* mecánico bloquea el paso del haz cuando no se desea excitar la muestra. Fue necesaria la colocación de un aislador óptico en el camino del haz para evitar que las reflexiones en los elementos ópticos vuelvan al láser, lo que genera inestabilidades en la potencia. Se utilizó una lámina de media onda (Thorlabs) y una de cuarto de onda (Thorlabs) para alcanzar una polarización circular sobre la muestra.

Sumado a estas dos fuentes de luz, utilizadas en las aplicaciones que se presentarán en los capítulos 5 y 6, el microscopio puede adaptarse fácilmente para utilizar una fuente de luz blanca basada en una fibra óptica de cristal fotónico (PCF, Femtowhite 800, fabricada por NKT Photonics) disponible para el microscopio. Este esquema de trabajo fue presentado anteriormente [Masip, 2011] y consiste en tomar la luz blanca producida en la PCF y filtrarla con un monocromador para obtener una excitación monocromática pero variable. Luego, la salida del monocromador es acoplada en una fibra óptica (la misma que se usa para el láser verde) y la salida enviada al microscopio. Este esquema permite barrer la longitud de onda de excitación en aplicaciones que así lo necesiten.

Por último, también se puede utilizar como fuente alternativa al Ti:Za una novedosa fuente de luz solitónica infrarroja, rápidamente sintonizable que se presentará en detalle en el capítulo 6.

4.3.2. Superposición de los haces

Se busca lograr que los dos haces queden superpuestos en la muestra para asegurar que se esté examinando el mismo punto simultáneamente con ambos. Para esto, ambos láseres se mezclan en un espejo dicroico que refleja el láser NIR y transmite el visible (DM 750dcspxr, Chroma Technology corp.). Luego son enviados al objetivo de microscopio (OM) que los enfoca en la muestra, como se muestra en la figura 4.2. En segundo lugar se ajusta la colimación del láser NIR con el telescopio 1x (formado por dos dobletes acromáticos) para que los dos láseres se enfoquen en el mismo plano en la muestra.

Finalmente, la alineación fina para la superposición de los haces se realiza con dos espejos de alineación en el camino del láser infrarrojo (estos espejos no se muestran en la

³El rango donde se obtienen valores de potencia altos es más pequeño, pero se alcanzan los límites del intervalo resignando potencia.

Capítulo 4. Microscopía confocal de doble haz

figura para simplificar) mientras se mide la PSF de *scattering* de ambos haces alternativamente. El procedimiento de superposición termina cuando las PSF de ambos láseres tienen el mismo centro.

4.3.3. Detección confocal

Como puede verse en la figura 4.2, el objetivo de microscopio se utiliza para enfocar los láseres y también para colectar la luz emitida por la muestra (ya sea *scattering* o fluorescencia), que vuelve sobre su propio camino para llegar al módulo de detección.

Se implementaron dos caminos de detección independientes, uno para la medición de *scattering* y otro para la detección de fluorescencia. En el primer caso se utiliza una película divisora de haz (*pellicle beam splitter*, BSp en la figura 4.2, con $T = 92\%$ y $R = 8\%$, Thorlabs) para enviar la luz que vuelve de la muestra a la detección. Se utiliza una lente de 10 cm de distancia focal (doblete acromático AC254-100-A-ML, Thorlabs), para enfocar esta luz sobre un *pinhole* de 100 μm de diámetro (modelo P100S, Thorlabs), justo antes del detector. Para detectar se utiliza un fotomultiplicador (PMT, modelo R928, Hamamatsu), alimentado por una fuente de alta tensión entre -500 y -1000 V, según el nivel de señal obtenido. Cabe notar que el tamaño del *pinhole* fue elegido unas diez veces mayor al tamaño del disco de Airy que genera el sistema óptico (lo recomendado es que sea entre dos y tres veces mayor [Webb, 1996]) para que el proceso de alineación sea más sencillo.

Por otro lado, para la detección de fluorescencia se utiliza un espejo dicroico con alta reflectividad para $\lambda < 550\text{ nm}$ y alta transmisión para $\lambda > 550\text{ nm}$, de manera tal que refleja el láser verde para la excitación de fluorescencia y transmite la emisión. La luz transmitida por el dicroico es enfocada con una lente de distancia focal 30 cm (AC254-300-A-ML, Thorlabs) en una fibra óptica multimodo (M31L01, Thorlabs) que tiene 62,5 μm de diámetro de núcleo y actúa como *pinhole* confocal. En este caso la relación entre el diámetro del disco de Airy y del núcleo de la fibra es de $\sim 2,55$.

A la salida de la fibra se utiliza un colimador (F220FC-A, Thorlabs) y se selecciona entre una detección espectral o un detector puntual con un espejo rebatible. En el caso de la detección puntual, se coloca un filtro *notch* (NF, NF03-532E-25, Semrock) para remover completamente el láser de excitación y un filtro pasa bajos (SPF, ET680sp2p, Semrock) con corte en 680 nm, que bloquea completamente el láser infrarrojo. De esta manera se asegura detectar solo la fluorescencia emitida por la muestra sin importar la presencia del láser infrarrojo, brindando un rango espectral de detección entre 550 y 680 nm. Se utiliza un fotodiodo de avalancha (APD, modelo SPCM-AQR-12, Perkin Elmer) o un fotomultiplicador (PMT, modelo R928, Hamamatsu), según la aplicación lo requiera⁴.

4.3.4. Módulo de detección espectral

El módulo espectral (ESPEC en la figura 4.2) consta de una red de difracción de 300 líneas por mm(GT13-03, Thorlabs) y una cámara CCD (altaU2000, Apogee Imaging Systems Inc.) como detector (se utiliza un doblete acromático de $f = 5\text{ cm}$ para enfocar en la CCD). Este dispositivo fue desarrollado por Mauro Silberberg y Alan Rios Fukelman

⁴Para el caso del APD se agrega una lente para enfocar el haz en el área de detección, que no es necesaria para el caso del PMT pues el área sensible es más grande que el haz.

4.4. Caracterización del microscopio de doble haz

durante su proyecto de la materias Laboratorio 6 y 7 de la carrera Licenciatura en Ciencias Físicas, FCEyN, UBA. Los detalles de construcción y caracterización se pueden encontrar en el informe correspondiente [Silberberg y Fukelman, 2015].

Con este espectrómetro se pueden obtener espectros de emisión de una zona específica de la muestra (gracias a la detección confocal), en el rango 400-1000 nm. En la presente tesis el módulo espectral resulta de vital importancia para el estudio de Raman intensificado por superficie (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, SERS) que se presentará en el capítulo 5.

4.4. Caracterización del microscopio de doble haz

La principal caracterización realizada sobre el microscopio consiste en el estudio de la resolución del mismo, a través de la medición de la PSF. Para esto se necesita hacer imagen de una fuente puntual en el plano focal, que se verá ensanchada, como se mencionó anteriormente. Experimentalmente se tiene una fuente puntual cuando las dimensiones de la fuente son mucho más pequeñas que la resolución del microscopio que se desea estudiar. Para el caso de microscopios ópticos esto se logra utilizando moléculas únicas o nanopartículas metálicas, que pueden aproximarse como puntuales para efectos prácticos. En el apéndice C se discute brevemente este punto y se muestran cálculos teóricos que muestran los rangos de validez de esta aproximación.

Además de la medición de la PSF, una característica importante de un microscopio es la estabilidad. Se corroboró que el microscopio construido posee una gran estabilidad mecánica, que permite realizar imágenes durante más de 20 minutos sin necesidad de corregir el foco.

4.4.1. PSF de *scattering*

En el caso de la detección en modo *scattering*, para medir la PSF se utilizaron nanopartículas (NPs) de oro de 80 nm de diámetro, que son muy convenientes pues proveen un gran brillo y no sufren fotodegradación. Estas nanopartículas son ideales para trabajar en la zona verde del espectro visible pues tienen allí una marcada resonancia de *scattering*. Además, la preparación de la muestra es sencilla, consiste en depositar NPs sobre un cuadroobjetos limpio, con una concentración tal que queden separadas varios micrones unas de otras. Una vez depositadas las NPs, se sella la muestra con un porta objetos utilizando aceite de inmersión para empalmar el índice de refracción y evitar así la reflexión en la interfase donde las NPs fueron depositadas.

En la figura 4.3 se muestran cortes en los planos XY (a) y XZ (b) de la PSF de *scattering* para el láser verde, realizadas utilizando la muestra de NPs mencionada anteriormente. Se agregan perfiles de la zona central ($x=0$) en cada imagen. Se obtuvo un valor de ~ 460 nm en la dirección lateral y $\sim 1,9$ μm en la axial. Luego se caracterizó la PSF del Ti:Za, que se muestra en las figuras 4.3 (c) y (d). En este caso el ancho altura mitad (*Full Width Half Maximum*, FWHM) lateral resulta de ~ 600 nm y la axial de $\sim 2,6$ μm . Las imágenes fueron tomadas con 150x150 px, cada uno con un tamaño de 33x33 nm, y un tiempo de integración de 0,7 ms/px.

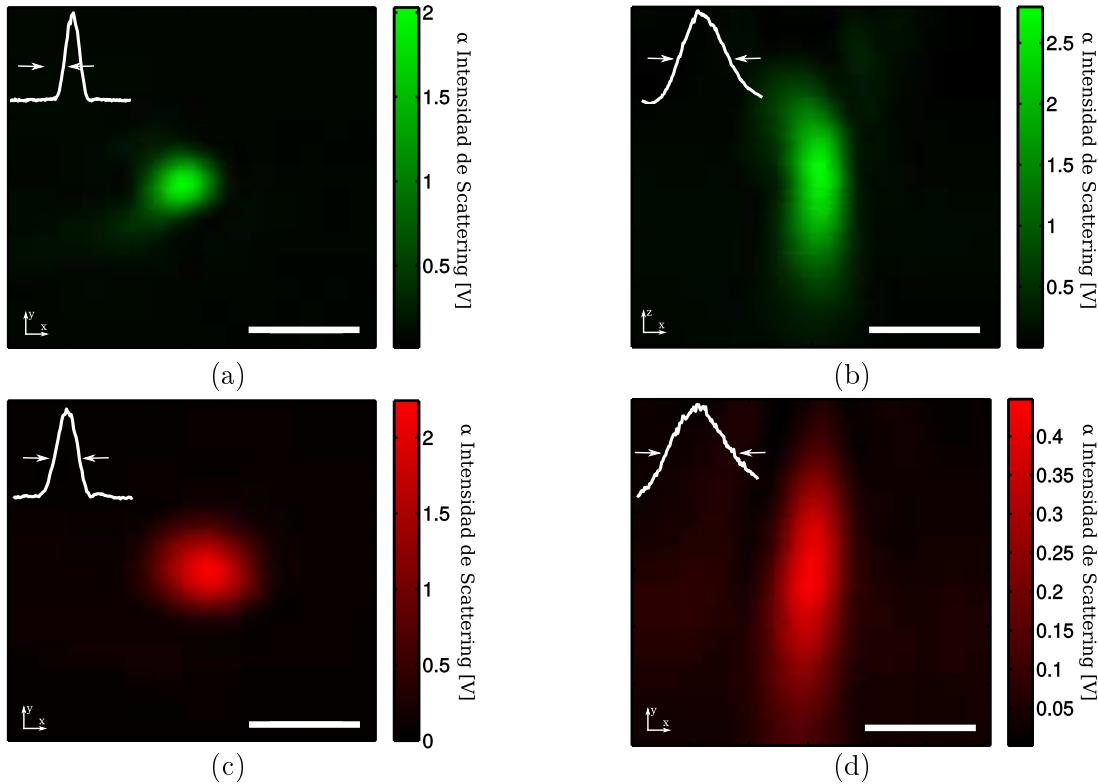


Figura 4.3: PSF de scattering. (a)Corte transversal (XY) en el plano focal para el láser verde. La curva muestra un perfil vertical en el centro de la imagen, que muestra un ancho altura mitad de ~ 460 nm. (b)Corte axial (XZ) en $y = 0$, con un perfil vertical que muestra un FWHM de $\sim 1,9$ μm. (c)Corte transversal de la PSF de scattering para el láser infrarrojo, con un perfil vertical que exhibe un valor de ~ 630 nm para el FWHM. (d)Corte XZ de la PSF del Ti:Zn, con un FWHM $\sim 2,6$ μm. Barras de escala: 1 μm (horizontal y vertical).

4.4.2. PSF de fluorescencia

Para medir la PSF en la detección de fluorescencia, se utilizaron como sondas esferas de látex de 200 nm de diámetro, con una gran cantidad sondas fluorescentes “*orange fluorescent*” adentro (número de catálogo F-8809, comercializadas por Life Technologies), que tiene el pico de excitación en 540 nm y el de emisión en 560 nm. Estas esferas proveen un excelente brillo y efectos de fotoblanqueo reducidos, lo que permite medir la PSF varias veces antes de perder la señal por fotoblanqueo.

En la figura 4.4 se muestran dos cortes, en los planos XY (a) y XZ (b), donde el mapa de colores indica intensidad de fluorescencia y en las curvas se muestran perfiles verticales de intensidad tomados en el centro de la imagen. El FWHM resulta de ~ 500 nm ($\sim 1,6$ μm) para el caso del corte en XY (XZ).

Cabe notar que esta PSF se ve un poco ensanchada por el hecho que la perla fluorescente tiene un tamaño similar al de la PSF. Este valor puede ser deconvolucionado para obtener el ancho real de la PSF, que resulta ~ 460 nm (ver el apéndice C para más detalles). Este valor está un 20 % encima del valor límite de Abbe, debido a que no se sobrellenó el plano focal trasero del objetivo y por lo tanto no se alcanza la máxima resolución posible.

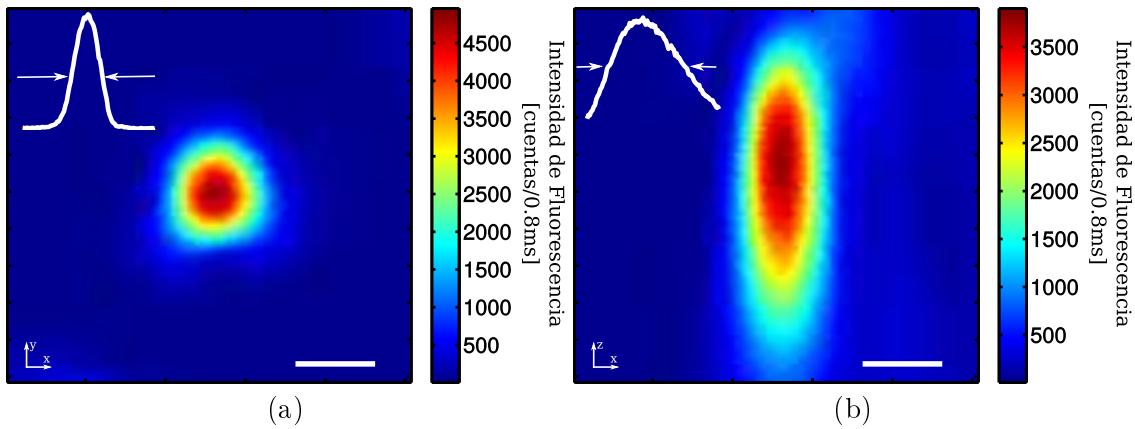


Figura 4.4: PSF de fluorescencia. (a) Corte transversal (XY) en el plano focal. La curva muestra un perfil vertical en el centro de la imagen, que muestra un FWHM de ~ 500 nm. (b) Corte axial (XZ) en $y = 0$. La curva muestra un corte vertical de la imagen, que muestra un FWHM de $\sim 1,6 \mu\text{m}$. Barras de escala: 500 nm (horizontal y vertical).

4.5. Galería de imágenes confocales

Se presentan aquí algunos ejemplos de imágenes tomadas con el microscopio confocal *home-made*, tanto en el modo *scattering* como en el modo fluorescencia.

La figura 4.5 muestra una imagen de fluorescencia tomada a células HC11 fijadas, donde se utilizó faloidina conjugada con la sonda fluorescente TRITC (*Tetramethylrhodamine*) para etiquetar específicamente los filamentos de actina⁵. En la imagen se distinguen varias células (se distinguen por el núcleo que se observa como un hueco en la red de filamentos) y se pueden identificar varios filamentos de actina, que se ven como fibras finas y largas. En la línea punteada se realizó un perfil de intensidad que puede verse en el recuadro pequeño de la figura, donde se marca el ancho de un filamento de ~ 500 nm. Dado que los filamentos de actina son del orden de las decenas de nanómetros de ancho, esta medición permite estimar la resolución del microscopio.

También se realizaron imágenes de *scattering* de un grupo de nueve nanoestructuras de silicio, agrupadas en tres filas y tres columnas. Cada nanoestructura consiste en dos discos de silicio y se construyeron dos tamaños: en una el diámetro es de 400 nm y en otra de 220 nm. En ambos casos la altura de los discos es 200 nm y están separados por un gap de 20 nm. En la figura 4.6, panel superior, se muestra un esquema de las dos estructuras y en (a)-(d) las imágenes de *scattering* tomadas con los dos láseres disponibles en el microscopio. El origen del contraste inverso en estas estructuras se explica en [Masip, 2011]; brevemente, se debe a que la detección de *scattering* en reflexión es intrínsecamente homodifusión, siendo la señal de la muestra mezclada interferométricamente con la reflexión en el sustrato. Se puede observar que las estructuras más grandes generan mayor contraste que las pequeñas. En el capítulo 5 se estudiarán en detalle estas nanoestructuras de silicio, particularmente su comportamiento térmico.

⁵La muestra utilizada por fue cortesía Lorena Sigaut y Juan Burdiso, del Centro de Microscopías Avanzadas (CMA), FCEyN, UBA.

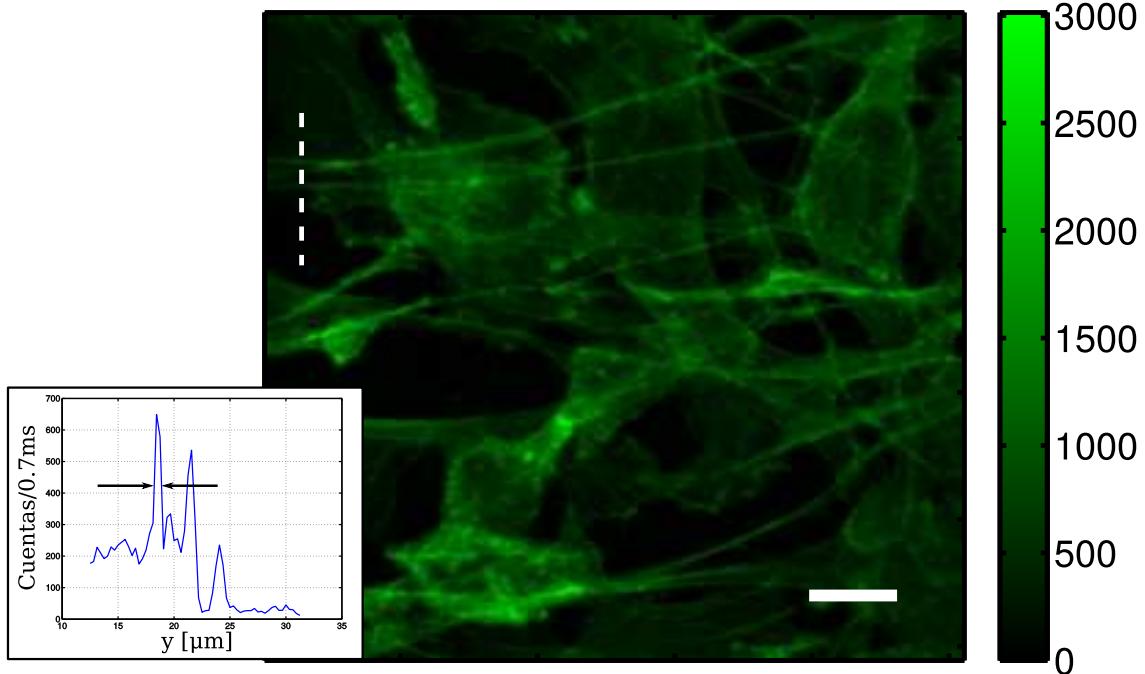


Figura 4.5: Imagen confocal de células fijadas. Se trata de células de fibroblastos 3T3, marcadas con faloidina-TRITC. Se puede observar distintas células y un excelente contraste en la imagen. La escala de colores muestra la cantidad de cuentas detectadas en 0,7 ms. Barra de escala: 10 μm . El recuadro pequeño muestra un perfil realizado en la línea punteada, donde se marca un filamento de actina que se ve con un diámetro de ~ 500 nm.

4.6. Conclusiones

Para resumir, en este capítulo se presentó el diseño del microscopio combinado completo, que permite en la misma plataforma realizar imágenes combinadas AFM-*wide field* y de microscopía confocal de fluorescencia y/o *scattering*, con la particularidad de tener dos haces de excitación, uno visible y otro en el infrarrojo cercano.

Este equipo, que es una plataforma totalmente abierta, permite adaptaciones a la aplicación específica que se utilice, debido a su gran versatilidad y a la cantidad de modos de iluminación y detección disponibles. En los capítulos siguientes se mostrarán aplicaciones concretas realizadas durante la presente tesis que ponen en evidencia la versatilidad de este equipo.

Adicionalmente, se puede decir que esta plataforma puede transformarse fácilmente en un microscopio óptico de campo cercano sin apertura (*Apertureless Near-Field Scanning Optical Microscope ANSOM*), ya que la punta de AFM puede funcionar como sonda de campo cercano utilizando el sistema presentado de detección de *scattering*. Más aún podrían efectuarse experimentos de intensificación de fluorescencia por punta (*tip-enhanced fluorescence*) utilizando la detección de fluorescencia, de manera similar a lo presentado en Yang *et al.* [2000].

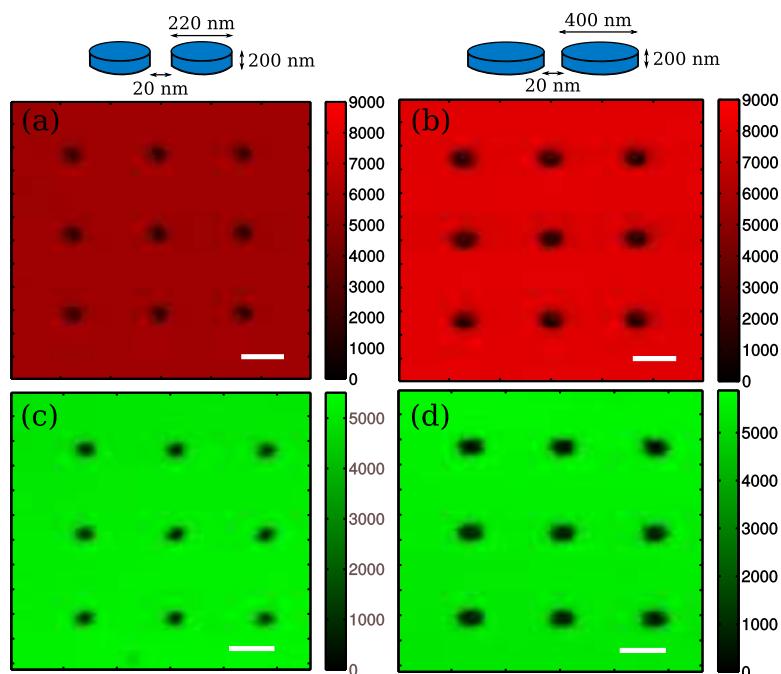


Figura 4.6: Imagen confocal de *scattering* de nanoestructuras de silicio. En los esquemas superiores se muestran las dimensiones de cada nanoestructura. Los mapas de colores marcan las cuentas detectadas en un tiempo de integración de 0,7 ms. (a) Nanoestructuras pequeñas medidas con el Ti:Za ($\sim 15 \mu\text{W}$). (b) Nanoestructuras grandes medidas con el Ti:Za. (c) Nanoestructuras pequeñas con el láser de excitación en 532 nm ($\sim 5 \mu\text{W}$). (d) Nanoestructuras grandes medidas con el láser verde. Barras de escala: 2 μm .

Capítulo 4. Microscopía confocal de doble haz

Capítulo 5

Aplicaciones a la nanoplasmónica

En este capítulo se presentan dos aplicaciones en el área de la nanoplasmónica donde se utiliza el microscopio confocal de doble haz presentado anteriormente. La primera consiste en un ensayo de biosensado molecular, basado en la reducción de fluorescencia por calentamiento de nanobarras metálicas superficialmente modificadas y excitadas en resonancia. En la segunda, se presentan novedosas nanoantenas de silicio, que son intensificadoras de la luz emitida por las moléculas circundantes, pero sin el calentamiento asociado que sí muestran las más conocidas nanoantenas metálicas.

El comportamiento térmico de nanoestructuras como respuesta a una excitación resonante es el común denominador entre estas dos aplicaciones. En la primera se utiliza el calentamiento por excitación de plasmones en nanobarras metálicas como una herramienta para el biosensado. Este trabajo fue hecho en colaboración con el laboratorio del Prof. Fernando Stefani del CIBION-CONICET. En la segunda aplicación se compara el calentamiento de nanoestructuras metálicas y dieléctricas, para el estudio de una novedosa plataforma fotónica basada en nanoantenas de materiales no plasmónicos (dieléctricos). En particular se trabajó con nanoantenas de silicio, que permiten intensificaciones de campo interesantes sin los efectos asociados al calentamiento de la estructura. Este último trabajo fue realizado en colaboración con el laboratorio del Prof. Stefan Maier, del *Imperial College*, Londres, Inglaterra.

5.1. Biosensado molecular utilizando nanopartículas metálicas

Se presenta un esquema de biosensado molecular basado en la combinación de dos efectos: la dependencia de la emisión de la fluorescencia molecular con la temperatura y el calentamiento producido por excitación resonante de plasmones en nanobarras de oro. En esta sección se presenta un ensayo modelo que muestra que el mencionado mecanismo de sensado puede ser utilizado para detectar concentraciones sub-nanomolares de un analito de interés.

La versión extendida y los detalles del experimento y el mecanismo están descriptos en la tesis doctoral de Jésica Pellegrotti, (que presentará casi simultáneamente a esta Tesis) quien ha sido dirigida por el Prof. Stefani. Cabe destacar que ambos han recibido un premio Inovar 2014 por este nuevo esquema de biosensado. El trabajo producto de esta colaboración está en preparación para su publicación [Pellegrotti *et al.*, 2015].

5.1.1. Introducción y motivaciones

Los llamados **sensores moleculares** combinan el fenómeno de reconocimiento molecular específico con la detección de alguna señal fisicoquímica que reporta la presencia del analito o molécula blanco que se desea detectar. En particular, los llamados inmunoensayos, que utilizan anticuerpos específicos para reconocer la molécula blanco, son de gran interés debido a su amplia aplicación en medicina y en diagnóstico [Ligler y Taitt, 2011].

Existen diversos tipos de biosensores basados que permiten la detección de concentraciones sub-nanomolares, basados en distintos fenómenos ópticos como transferencia resonante de energía de Föster (*Foster Resonance Energy Transfer*, FRET) [Ohiro *et al.*, 2002] o la disminución de fluorescencia generada por cercanía de nanopartículas metálicas (*quenching*) [Mayilo *et al.*, 2009].

Se presenta aquí un nuevo esquema de biosensado homogéneo, basado en dos hechos: (1) la emisión de fluorescencia disminuye con el aumento de temperatura (para una gran cantidad de fluoróforos), (2) las nanopartículas metálicas transforman eficientemente energía lumínica en calor, especialmente cuando se las ilumina en su frecuencia de resonancia [Coronado *et al.*, 2011; Urban *et al.*, 2009]. El primer hecho, que se explica como una disminución de la eficiencia cuántica de una sonda fluorescente debido a la activación de canales no radiativos, ha sido utilizado como termómetro en diversas oportunidades, con sensibilidades de 1-2 %/K [Deprérand *et al.*, 2008; Natrajan y Christensen, 2009]. El segundo hecho también está altamente reportado en la literatura [Baffou *et al.*, 2010; Baffou y Quidant, 2013] y se ha utilizado para diversas aplicaciones como atravesar membranas biológicas [Urban *et al.*, 2011], la liberación de drogas en lugares específicos [Han *et al.*, 2007], el biosensado [Zijlstra *et al.*, 2012] y para el tratamiento del cáncer [Hirsch *et al.*, 2003; Gobin *et al.*, 2007; Lal *et al.*, 2008a].

5.1.2. Descripción e implementación del ensayo

El analito (A) que se desea estudiar se encuentra inmerso en una solución, que además contiene dos unidades de reconocimiento molecular del analito (RM1 y RM2) y los

5.1. Biosensado molecular utilizando nanopartículas metálicas

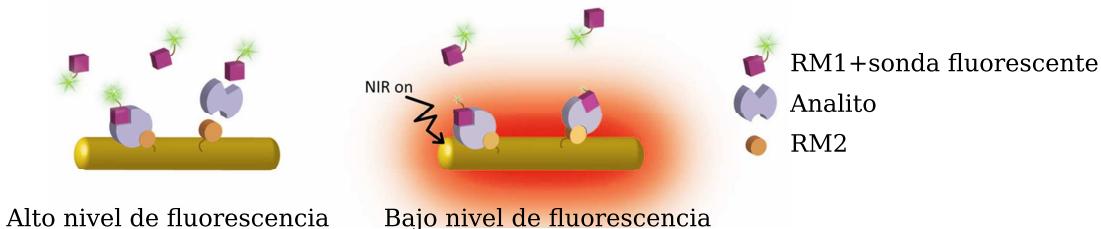


Figura 5.1: Esquema ilustrativo del principio de funcionamiento del ensayo. El analito construye un “sándwich” molecular con la unidad de reconocimiento molecular RM1, unida a la NP y la RM2, que está marcada fluorescentemente, situación en la que emite altos niveles de fluorescencia. Al encender el láser infrarrojo (NIR) se genera un campo de temperatura en la vecindad de los nanocilindros que genera una disminución en la emisión de fluorescencia.

nanocilindros de oro. Una de las unidades de reconocimiento (RM1) tiene adosado un fluorósforo y la otra (RM2) está covalente y superficialmente unida a los nanocilindros. Esto se muestra esquemáticamente en la Figura 5.1. Si suponemos que en un primer paso, el analito A, ha sido reconocido por RM2, de manera que A se ubica muy cercano a la superficie de los nanocilindros. En un segundo paso, RM2 podrá reconocer a A y formar el “sándwich” RM2-A-RM1. Si en todo momento se mide la luz emitida desde la solución por el fluorosforo, veremos una intensidad constante, enmascarando así el reconocimiento molecular. Sin embargo, si ahora se ilumina la solución con una longitud de onda tal que las nanobarras estén excitadas en resonancia de plasmones, éstos convertirán parte de la energía absorbida en calor, elevando localmente la temperatura y provocando la disminución de fluorescencia de las sondas fluorescentes que estén cerca de su superficie, es decir, de aquellos que reconocieron a A.

Dado que las nanobarras de oro utilizados para este ensayo tienen una resonancia plasmónica longitudinal en el infrarrojo cercano (NIR), se puede utilizar esta resonancia para generar eficientemente un campo de temperatura y dejar la zona del visible para la excitación y detección de fluorescencia. Por lo tanto, al iluminar la muestra con un láser infrarrojo (NIR) la señal de fluorescencia proveniente de los fluorósforos en el ensayo disminuye mientras que los restantes en solución no son afectados.

Para la prueba de principios del mecanismo descripto para este ensayo, se utilizó la unión biotina-estreptavidina como unidades de reconocimiento (RM1 y MR2), donde la estreptavidina juega el papel del analito A. Se utilizaron nanobarras de oro comerciales, de tamaño nominal 22 x 95 nm, con su superficie funcionalizada con biotina, cuyo espectro de absorción se muestra en la figura 5.2 (a), junto con los espectros de excitación y emisión de la sonda fluorescente utilizada, AlexaFluor546. Esta sonda fluorescente fue conjugada con biotina o estreptavidina según el experimento a realizar.

Los experimentos fueron realizados con una muestra en solución en el microscopio de doble haz presentado en el capítulo 4, con el agregado de un *chopper* para implementar una detección *Lock In* y el uso de un PMT como detector, como se esquematiza en la figura 5.2 (b). El láser de calentamiento (CW Ti:Za) fue sintonizado en $\lambda = 785$ nm y el de excitación en $\lambda = 532$ nm, con un volumen de detección de fluorescencia $\sim 0,2$ fl.

El primer paso para realizar el experimento consiste en superponer cuidadosamente los

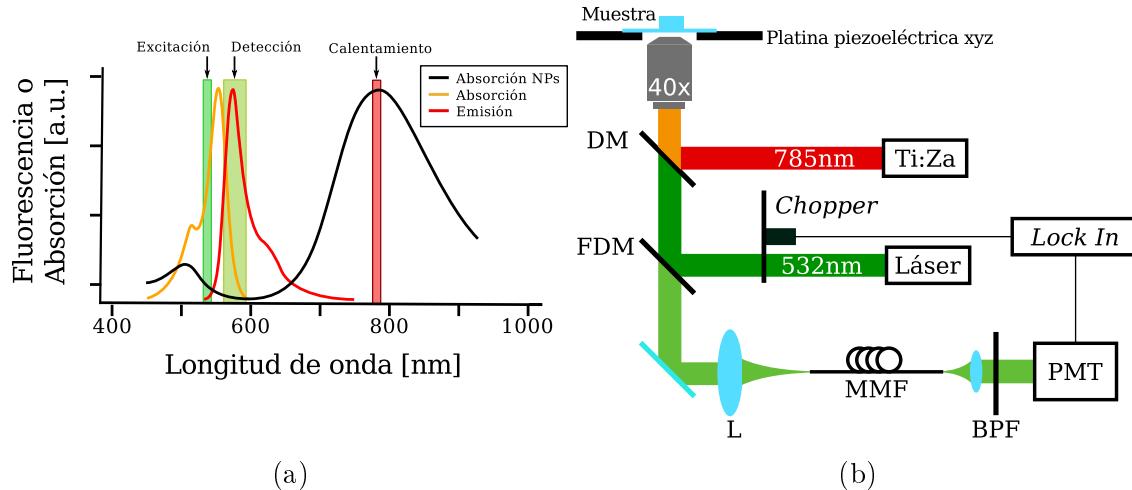


Figura 5.2: Implementación experimental del ensayo. (a) Espectro de absorción de las nanobarras y espectros de excitación y emisión de la sonda fluorescente AlexaFluor546. Se muestran con recuadros verticales la excitación y la banda de detección de fluorescencia y el laser NIR que se utiliza para calentar. (b) Esquema del dispositivo experimental. Se trata del microscopio confocal de doble haz con el agregado de un *chopper* para poder detectar con el *Lock In* la señal de fluorescencia (se usa un PMT como detector). En este caso se coloca un filtro pasabanda (BPF) para detectar la fluorescencia en el rango 550-590 nm.

dos láseres de manera que los centros sus PSFs queden superpuestos. De esta manera queda asegurada la detección de fluorescencia de las nanobarras que son calentados. Para realizar los experimentos se mantiene encendido el láser de excitación en todo momento (solo es interrumpido intermitentemente por el *chopper*) y el láser de calentamiento se bloquea alternativamente con un obturador y su potencia se varía con un filtro neutro variable, lo que permite estudiar el efecto que genera sobre la muestra en diversas condiciones.

5.1.3. Disminución selectiva de la fluorescencia

Para demostrar experimentalmente el principio de funcionamiento del biosensor y su especificidad química, se preparó un ensayo con las nanobarras biotiniladas y un exceso ($20 \mu\text{M}$) del conjunto AlexaFluor546-estreptavidina. Se estudió la emisión de fluorescencia cuando se enciende el láser infrarrojo a distintas potencias, como se muestra en la figura 5.3.

Debido a que la temperatura que alcanzan las NPs es proporcional a la intensidad de la luz incidente, se espera una mayor caída de la fluorescencia al incrementar la potencia del láser NIR. En efecto, al encender el láser de calentamiento se observa experimentalmente una clara disminución de la fluorescencia, que crece cuando se aumenta la densidad de potencia, como se aprecia en la figura 5.3 (a). Este fenómeno es reversible y repetible, como puede verse a partir de la figura 5.3 (b), donde se muestran varios ciclos de encendido y apagado del láser de calentamiento. Luego se estudió en detalle la dependencia con la densidad de potencia de calentamiento, dando lugar al gráfico de la figura 5.3 (c)(curva roja). Se observa que a partir de los 2000kW/cm^2 la señal se satura en un valor del 60%.

5.1. Biosensado molecular utilizando nanopartículas metálicas

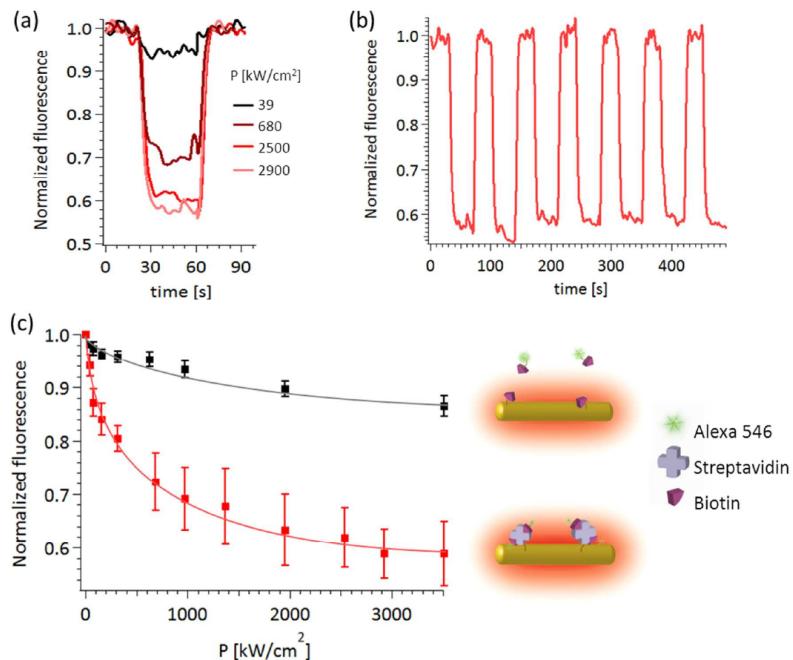


Figura 5.3: Disminución de fluorescencia fototérmica. (a) Trazas temporales de emisión de fluorescencia (normalizadas). Al encender el láser infrarrojo se observa un decaimiento en la fluorescencia, que aumenta con el aumento de la densidad de potencia. (b) Trazas temporales de múltiples ciclos de encendido apagado de fluorescencia del NIR, que muestran la reversibilidad del proceso. (c) Emisión de fluorescencia para distintas potencias de NIR. (rojo) ensayo específico, (negro) señal debido al pegado no específico. Las líneas son guías visuales. También se muestra un esquema pictórico de las dos situaciones. Extraído de [Pellegratti *et al.*, 2015].

Además de este estudio es necesario realizar un experimento de control, que consiste en utilizar las mismas nanobarras pero en lugar de utilizar estreptavidina-AlexaFluor546 se utilizó biotina-AlexaFluor546. En este caso los fluoróforos no deberían permanecer en las vecindades de las nanobarras a menos que se unieran de manera no específica y, por lo tanto, se espera que la señal de fluorescencia no disminuya con el aumento de potencia del laser de calentamiento. En la figura 5.3 (c) la curva negra muestra los resultados obtenidos para el mencionado experimento de control: se observa una disminución de fluorescencia de un 10 %. Esto demuestra que la caída fototérmica de fluorescencia observada en el caso específico se debe principalmente a la unión de fluoróforos a través del analito.

5.1.4. Sistema modelo: detección de estreptavidina en un ensayo tipo “sándwich”

Finalmente, se muestra una aplicación concreta del presentado fenómeno de disminución de fluorescencia selectiva por calentamiento utilizando un sistema modelo, biotina-estreptavidina. Se trata de un ensayo tipo sándwich donde se utilizan las nanobarras de oro biotiniladas y complejos de biotina-AlexaFluor546. Cuando se agrega streptavidina se forman “sándwiches moleculares” biotina-estreptavidina-biotina, que pone los fluoróforos en las vecindades de las nanobarras, donde será apreciable el aumento de temperatura

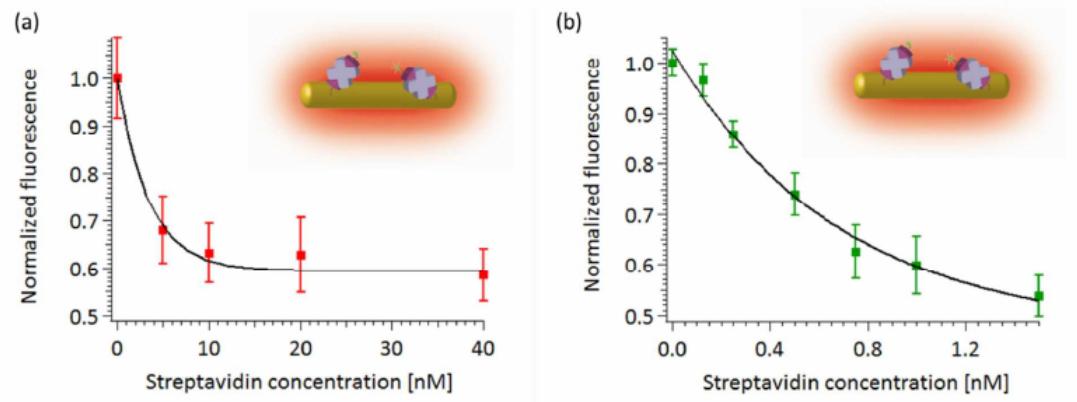


Figura 5.4: Ensayo tipo sándwich para determinar la concentraciones de un analito. Se muestra la emisión de fluorescencia normalizada, cuando se incide la muestra con el láser de calentamiento a una potencia fija, en función de la concentración de estreptavidina. Se muestran dos ensayos distintos: (a) 1nM de AuNR-biotina + 80nM AlexaFluor 546-biotina y (b) 1nM AuNR-biotina + 5 nM AlexaFluor 546-biotina. Las lineas son ajustes exponenciales decrecientes con constante de decaimiento θ . Se obtuvo $\theta = 3,5\text{ nM}$ para (a) y $\theta = 0,7\text{ nM}$ para (b). Extraido de [Pellegratti *et al.*, 2015].

inducido por el láser infrarrojo y por lo tanto disminuirán su emisión. Aumentar la concentración de estreptavidina (que en este caso es el analito A) más cantidad de fluoróforos formaran el sándwich y serán ubicados en las vecindades de las NPs, lo que llevará a una mayor disminución de fluorescencia.

En la figura 5.4 se muestran las curvas en función de la concentración de estreptavidina para dos condiciones experimentales; (a) muestra la curva con una concentración de 80 nM de biotina-AlexaFluor546 y (b) cuando se utiliza una concentración de 5 nM de biotina-AlexaFluor546. En ambos casos se puede ver que la fluorescencia disminuye notablemente al aumentar la concentración del analito A. Se realizaron ajustes exponenciales de cada curva con la dependencia $y = y_0 + Ae^{-x/\theta}$, de manera que θ es una medida de la sensibilidad del ensayo. En el primer caso se obtuvo $\theta = 3,5\text{ nM}$ y en el segundo caso $\theta = 0,7\text{ nM}$. Esto muestra que variando la concentración de los componentes se puede seleccionar el rango dinámico y la sensibilidad del ensayo.

5.1.5. Conclusiones

Se mostró experimentalmente que el aumento de temperatura por calentamiento plasmónico(fotoinducido) de nanobarras de oro puede disminuir selectivamente la emisión de fluorescencia de sondas en las vecindades inmediatas de la superficie de las nanobarras. Esta combinación de calentamiento plasmónico y la sensibilidad de la emisión de fluorescencia molecular permite la cuantificación de concentraciones superficiales en un ensayo tipo sándwich. El proceso de sensado es puramente óptico (se mide fluorescencia y se calienta a través de luz infrarroja) y provee una alta sensibilidad, que alcanza para detectar concentraciones por sub-nanomolares. Estas concentraciones son adecuadas para diversas aplicaciones como la determinación de concentración de proteínas u hormonas en ensayos clínicos.

5.2. Nanoantenas intensificadoras no-plasmónicas

La llamada **nanoplasmónica** ha revolucionado la manera de controlar la luz en escalas nanométricas, debido a la posibilidad de diseñar y fabricar nanoestructuras metálicas con formas específicas que dan lugar a campos electromagnéticos ultra confinados y altamente intensificados en los llamados *hot spots*. Dispositivos con esta notable propiedad de confinar la luz se conocen como **nanoantenas** y han tenido un alto impacto en el estudio de interacciones moleculares, efectos no lineales y dispositivos fotónicos en la nanoescala.

Sin embargo, los altos valores de intensificación que brindan las nanoantenas metálicas vienen acompañados de grandes pérdidas, debido a la absorción de luz en el metal, lo que limita severamente las aplicaciones fuera del ámbito académico. Por ejemplo, el calentamiento local que provocan las absorciones ópticas limita la potencia total que se puede entregar en una nanoantena pues esta comienza a derretirse y perder sus propiedades de confinamiento. Además, las moléculas en la vecindad de las nanoantenas pueden verse afectadas por el cambio de temperatura generado por la nanoantena.

Se presentan aquí nuevas **nanoantenas no-plasmónicas** fabricadas con silicio, que evitan estos problemas pues logran confinar la luz en el campo cercano con una conversión de energía óptica a térmica ultra baja [Caldarola *et al.*, 2015]. En particular, se muestra la intensificación de fluorescencia y de *scattering Raman*. Se expondrá también el método desarrollado para la medición de temperatura utilizando films delgados con moléculas fluorescentes.

5.2.1. Introducción y motivaciones

En un sentido amplio una antena es un dispositivo que se utiliza para direccionar de manera selectiva el campo electromagnético. En particular, se suelen utilizar para emitir ondas hacia el campo lejano¹ a partir de fuentes localizadas y viceversa. Un ejemplo más cotidiano es el de una antena de radio o microondas, que permiten la generación de ondas propagantes en esa porción del espectro electromagnético a partir de señales eléctricas para el caso de un emisor y la conversión inversa para el caso de un receptor [Graf, 1999]

En analogía con las antenas de microondas o radio, las llamadas **antenas ópticas** se definen como un dispositivo diseñado para convertir eficientemente campos ópticos propagantes en energía localizada y viceversa [Novotny y van Hulst, 2011; Bharadwaj *et al.*, 2009]. Dado que las longitudes de onda involucradas para los campos ópticos se encuentran en la escala de los cientos de nanómetros, las dimensiones características de este tipo de dispositivos caen en la nanoescala y, por lo tanto, también son llamadas nanoantenas.

Una aplicación inmediata de las nanoantenas se da en el campo de la microscopía, ya que permiten confinar la luz en volúmenes mucho más pequeños que los accesibles con los elementos convencionales (lentes) y, por lo tanto, permiten obtener imágenes con resolución por debajo del llamado límite de difracción, establecido por Ernest Abbe en 1873 [Abbe, 1873]. La génesis de esta idea fue presentada por E. H Synge, quien en 1928

¹Se utiliza el término campo lejano en el sentido de la expansión multipolar del campo electromagnético: dada una fuente acotada por d , se desarrollan los campos resultantes en series de potencias en $\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}$. Se considera el campo lejano a la zona donde el punto de observación r se encuentra muy alejado de la fuente, es decir, $d \ll \lambda \ll r$ donde λ es la longitud de onda de la radiación.

Capítulo 5. Aplicaciones a la nanoplasmónica

propuso utilizar una apertura pequeña para realizar imágenes con resolución por debajo de la longitud de onda de la luz utilizada [Synge, 1928]. Por supuesto en esa época era técnicamente imposible el desplazamiento de esta apertura respecto de la muestra con la resolución y estabilidad necesaria. Tuvieron que pasar 44 años para la primer demostración experimental de que el límite de difracción podía ser sobrepasado: Ash y Nicholls lograron una resolución lateral de $\lambda/60$ utilizando microondas ($\lambda = 3\text{ cm}$) [Ash y Nicholls, 1972].

Poco más de una década después surgieron las patentes del microscopio de campo cercano [Pohl, 1984, 1986] o en inglés *Near-field scanning optical microscopy* (NSOM o bien SNOM) y el primer trabajo que muestra la utilización de este aparato [Pohl *et al.*, 1984], que utiliza una apertura pequeña como sonda para alcanzar una resolución de $\lambda/20$. Una aplicación notable de esta microscopía fue la visualización de los llamados plasmones superficiales de protuberancias nanométricas en una superficie de oro [Fischer y Pohl, 1989]. Años más tarde se propuso un cambio en el esquema de trabajo y se empezaron a utilizar puntas en lugar de aberturas como sondas para este tipo de microscopios [Inouye y Kawata, 1994]. Este esquema se implementó tanto en las plataformas de AFM [Bachelot *et al.*, 1997] como de STM [Bragas y Martínez, 2000], lo que permite obtener información de las propiedades ópticas de las muestras junto con la topografía.

A partir de estos trabajos pioneros que establecieron las técnicas de microscopía, se comenzaron a utilizar nanoantenas para diversas aplicaciones como la detección de moléculas fluorescentes [Harootunian *et al.*, 1986], la realización de imágenes ópticas con resolución nanométrica [Scarpettini *et al.*, 2009] y de moléculas únicas [Mivelle *et al.*, 2014b].

También existen otras aplicaciones que no están directamente relacionadas con las microscopías, como la intensificación de fluorescencia por superficie (*Surface Enhanced Fluorescence*, SEF) [Fort y Grésillon, 2008], la intensificación Raman por superficie (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, SERS) [Lal *et al.*, 2008b; Stiles *et al.*, 2008], la generación de armónicas superiores [Grinblat *et al.*, 2014; Aouani *et al.*, 2014], el estudio de dinámica con la técnica correlación de fluorescencia a altas concentraciones (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*, FCS) [Estrada *et al.*, 2008; Punj *et al.*, 2013], solo para mencionar algunas.

Han sido exploradas distintas geometrías para las nanoantenas, empezando por casos sencillos como una nanopartícula [Höppener y Novotny, 2008], o una antena monopolar [Taminiau *et al.*, 2007], hasta geometrías más elaboradas como una pirámide [Johnson *et al.*, 2012] o agujero de una fibra óptica con forma de moño (*boutie*) [Mivelle *et al.*, 2012]. Notablemente, combinando dos geometrías se ha logrado recientemente alcanzar resoluciones del orden de la décima de nanómetro en la detección de moléculas únicas [Mivelle *et al.*, 2014a].

El común denominador de las mencionadas aplicaciones de las nanoantenas es la intensificación altamente localizada de campo electromagnético, en volúmenes nanométricos. Esta intensificación de campo tiene su origen físico en las llamadas resonancias plasmónicas localizadas, también llamados **plasmones**, que son oscilaciones colectivas de los electrones de conducción en los metales [Maier, 2007].

Sin embargo, los metales como el oro y la plata presentan una principal desventaja: las transiciones interbandas presentes en frecuencias ópticas generan un mecanismo de pérdida; cuando un electrón en la capa de valencia absorbe un fotón y pasa a la superficie de Fermi o cuando un electrón en la superficie de Fermi absorbe un fotón para pasar a la

5.2. Nanoantenas intensificadoras no-plasmónicas

banda de conducción se pierde energía debido a las colisiones entre los electrones [Khurgin y Boltasseva, 2012; Naik *et al.*, 2013]. Este mecanismo de pérdidas lleva al calentamiento del metal por efecto Joule [Baffou y Quidant, 2013], que ha sido utilizado como una fuente de calor en la nanoescala [Baffou *et al.*, 2013] o para realizar imágenes [Boyer *et al.*, 2002], sumado a las aplicaciones ya mencionadas.

Para otras aplicaciones, el mencionado calentamiento representa una desventaja pues puede evaporar el líquido o solvente alrededor las nanoantenas o bien modificar o dañar las moléculas en sus inmediaciones [Mahmoudi *et al.*, 2013]. Además, dependiendo de la intensidad utilizada, las nanoantenas mismas pueden llegar a deformarse o derretirse [Kuhlicke *et al.*, 2013], lo que limita severamente la cantidad de energía que puede entregarse en los *hot spots*.

La propuesta presentada en las siguientes secciones consiste en utilizar nanoantenas fabricadas con un material no plasmónico, como el silicio en lugar de metales para obtener altos valores de intensificación sin el mencionado problema del calentamiento. Esto fue estudiado en detalle teóricamente para nanoantenas de dieléctricos con índice de refracción alto como el Si, Ge o GaP [Albella *et al.*, 2014] y aquí se presentan medidas experimentales que lo demuestran: se midieron factores de intensificación de SERS del orden de 10^3 y se observó el fenómeno de intensificación de fluorescencia (sin *quenching*) con aumentos de temperatura mínimos aun para altas intensidades incidentes.

5.2.2. Diseño de las Nanoantenas

En colaboración con el grupo del Prof. Stefan Maier, se diseñaron unas novedosas nanoantenas de silicio con resonancias en el infrarrojo cercano, cuyo comportamiento térmico se espera sea distinto al ya reportado para sus contrapartes metálicas. La forma y dimensiones de estas antenas fueron obtenidas luego de realizar cálculos numéricos que permiten analizar o mostrar la distribución del campo electromagnético, del espectro de absorción y *scattering*, tal y como fue presentado en detalle por Albella *et al.* [2013]. Brevemente, las simulaciones consisten en abordar el problema electromagnético completo, resolviendo las ecuaciones de Maxwell con las condiciones de contorno apropiadas, pudiendo así obtener la distribución de campo tanto en la zona cercana como en la lejana. Esto se realizó utilizando el programa comercial *Comsol Multiphysics 4.3a*, que provee rutinas en el estado del arte para resolver ecuaciones diferenciales en derivadas parciales. Las nanoantenas seleccionadas en base a los cálculos están formadas por dos discos idénticos de silicio, separados por un *gap* de 20 nm, con 220 nm de diámetro y 200 nm de alto.

En la figura 5.5 se muestra en el panel superior la distribución de campo eléctrico cercano, remarcando los discos que forman la nanoantena. Se puede observar que la intensidad máxima alcanzada en el *gap* es 5,5 veces mayor que el campo incidente E_0 , lo que representa una intensificación de campo aceptable: con estructuras similares de oro se reportaron intensificaciones dos veces más grandes [Heeg *et al.*, 2014], mientras que con estructuras de oro con forma de moño y *gaps* más pequeños (4 nm) se alcanzan valores de ~ 40 [Dodson *et al.*, 2013]. También se muestran los valores de sección eficaz de *scattering* y de absorción para distintas longitudes de onda, donde se puede ver una resonancia ancha alrededor de 860 nm (se marca con una línea vertical).

Cabe notar que el mecanismo físico detrás de las resonancias en el caso de las nanoantenas dieléctricas es distinto al de las metálicas: las antenas dieléctricas se basan en los

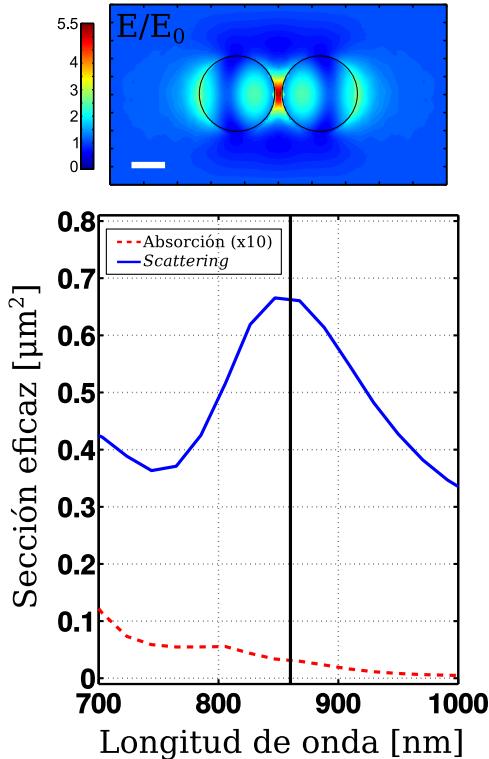


Figura 5.5: Caracterización teórica de las nanoantenas de silicio. En el panel superior se muestra la distribución de campo eléctrico cercano, cuando se incide con $\lambda = 860$ nm. Se puede apreciar una resonancia dipolar con valor máximo de 5,5 para la intensificación de campo en el *gap*. Barra de escala: 100 nm. En el gráfico se muestran los valores de sección eficaz de absorción y *scattering*, donde también se muestra con una línea vertical negra la longitud de onda de resonancia, 860 nm.

campos inducidos por los campos incidentes mientras que las antenas metálicas utilizan las oscilaciones del plasma que forman los electrones de conducción [Albella *et al.*, 2013].

Adicionalmente, se diseñaron nanoantenas de oro similares en forma pero de dimensiones distintas, de manera tal que presenten una resonancia en 860 nm y permitan comparar su comportamientos térmico con las de silicio en el mismo rangopectral. Las dimensiones de los discos de oro que logran este cometido son: 140 nm de diámetro, 50 nm de alto y 20 nm de *gap*.

Fabricación de la muestra y caracterización SEM

La fabricación de estructuras metálicas en la escala nanométrica se encuentra accesible hace algunos años gracias a la tecnología de litografía de barrido con un haz de electrones. Sin embargo, la fabricación de este tipo de estructuras nanométricas con materiales semiconductores como el silicio es todavía un desafío para este tipo de técnicas. En este caso las muestras fueron fabricadas en el centro de nanofabricación del *Imperial College London*, con un método desarrollado especialmente por gente de nuestro grupo de colaboradores. Se utiliza una técnica de litografía con haz de electrones (*Electron Beam Lithography*, EBL) que consiste en recubrir un sustrato de silicio-vidrio-silicio, es decir un

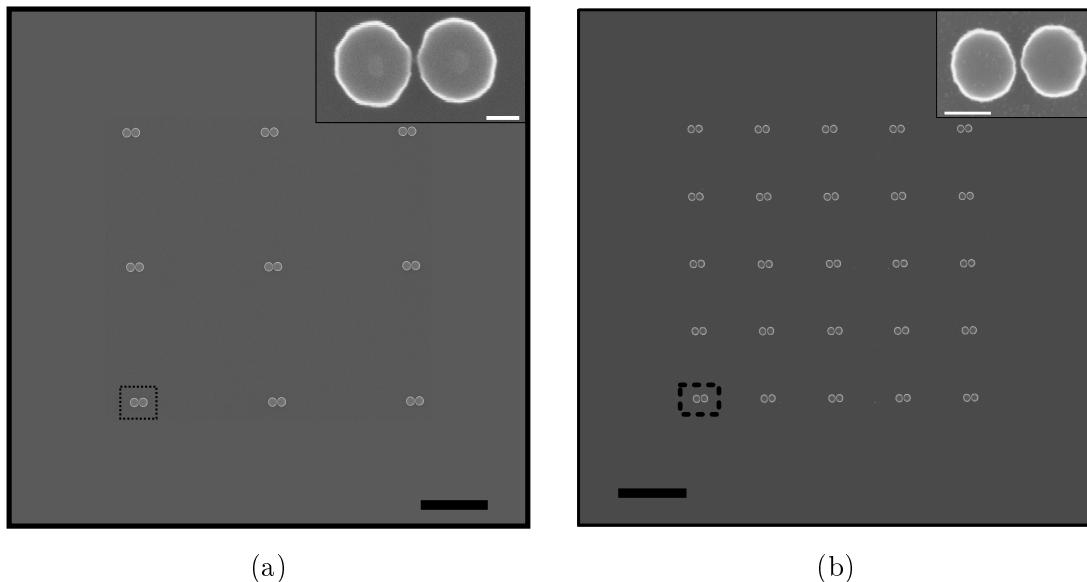


Figura 5.6: Imágenes SEM de las nanoantenas fabricadas. Se caracterizaron las dimensiones de las nanoantenas fabricadas en silicio (a) y en oro (b). Barra de escala negra: $2\text{ }\mu\text{m}$. Se puede ver una excelente coincidencia con las dimensones que se buscaban. En los recuadros pequeños de cada imagen se muestra una mayor magnificación de las estructuras recuadradas. Barra de escala blanca: 100 nm .

semiconductor-aislante-semiconductor (*silicon-on-insulator*, SOI) con el polímero PMMA (polimetilmetacrilato), que servirá de máscara positiva para el proceso de litografía.

En primer lugar el sustrato se recubre por *spin-coating* con un film de PMMA y se lleva a 180C° por 2 minutos. Los patrones para las nanoantenas de silicio se realizan con un haz de electrones, seguido de un procedimiento revelado (es decir, remoción del PMMA afectado por el haz de electrones). En segundo lugar, una capa de 10 nm de espesor de Cr se deposita utilizando el método de evaporación térmica. Dicho patron es luego levantado para transferirlo al sustrato de silicio utilizando *reactive ion-etching*, actuando el Cr como máscara y el óxido interno del sustrato como barrera para detener el proceso. Finalmente el excedente de Cr es removido utilizando *wet etching*, para obtener los dímeros de silicio. Las antenas de oro fueron fabricadas en una región diferente del sustrato, recubriendolo con PMMA y luego delimitando las dimensiones con el haz de electrones, evaporación de Au y luego revelado (remoción del excedente de PMMA).

La primer caracterización realizada en la muestra consiste en verificar las dimensiones deseadas realizando imágenes SEM de las mismas. En la figura 5.6 se muestran las imágenes para las antenas de silicio (a) y de oro (b) con un detalle de las antenas recuadradas. Se puede ver que las dimensiones coinciden excelentemente con las deseadas.

5.2.3. Rendimiento de las nanoantenas dieléctricas: SERS

Para probar el rendimiento de las nanoantennas de silicio como tales se realizó un experimento de intensificación Raman en superficie (SERS), para lo cual la muestra fue recubierta por una capa de 200 nm de PMMA. El objetivo es probar experimentalmente las propiedades de intensificación de las antenas.

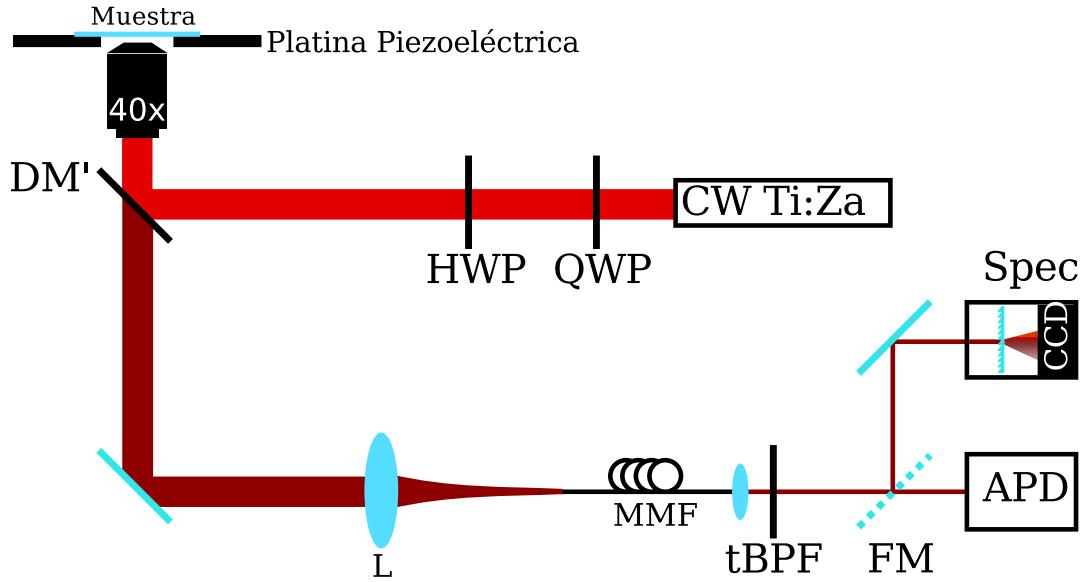


Figura 5.7: Esquema experimental para SERS. El microscopio confocal fue modificado levemente para poder realizar mapas y espectros Raman. El láser de Ti:Za se configura para tener polarización circular en la muestra con las láminas de onda (HWP y QWP). La excitación se refleja en el espejo dicroico (DM) y se enfoca en la muestra con un objetivo de microscopio (40X). El mismo objetivo colecta la emisión de la muestra, que se transmite en el DM y es enviado a la fibra confocal (MMF). Luego se coloca un filtro pasa banda sintonizable (tBPF) para seleccionar la banda de detección. Un espejo rebatible selecciona entre un APD para adquirir imágenes o el espectrómetro casero para tomar espectros Raman.

El experimento fue realizado en el microscopio confocal presentado en el capítulo 4, con una leve modificación para poder excitar la muestra con el láser de Titanio Zafiro en $\lambda = 860\text{ nm}$ y detectar el *scattering* Raman entre 392 y 639 cm^{-1} . El esquema se muestra en la figura 5.7. Se utilizó un espejo dicroico (FF875-D101-25X36, Semrock) para enviar el láser de excitación al objetivo ($\text{NA}=0.9$ UPLANSAPO, Olympus). La emisión de la muestra se colecta con el mismo objetivo y se envía a la fibra confocal. Luego se coloca un filtro pasabandas sintonizable (TB901-900/11-25X36, Semrock) y se alterna la posibilidad de realizar mapas Raman bidimensionales de la muestra con el APD como detector y espectros en zonas seleccionadas en la muestra, con un espectrómetro casero. Las imágenes fueron tomadas en un área de $15 \times 15\text{ }\mu\text{m}$, con un tamaño de píxel (px) de $75 \times 75\text{ nm}$ y un tiempo de integración de $4\text{ ms}/\text{px}$.

Se realizaron mapas bidimensionales de la intensidad Raman de la muestra excitando en la resonancia de las nanoantenas (860 nm). Dado que la intensidad es directamente proporcional al número de moléculas detectadas, es necesaria una normalización, pues la cantidad de moléculas en el volumen de detección en las zonas donde están las nanoantenas es menor que en el resto de la muestra. Es por eso que se realizó un mapa de referencia en condiciones experimentales similares pero fuera de resonancia, en $\lambda = 810\text{ nm}$, y detectando una banda entre 745 y 1007 cm^{-1} . En este caso, dado que la nanoantena no intensifica apreciablemente el campo eléctrico, se puede decir que se está obteniendo un mapeo de la distribución espacial de moléculas.

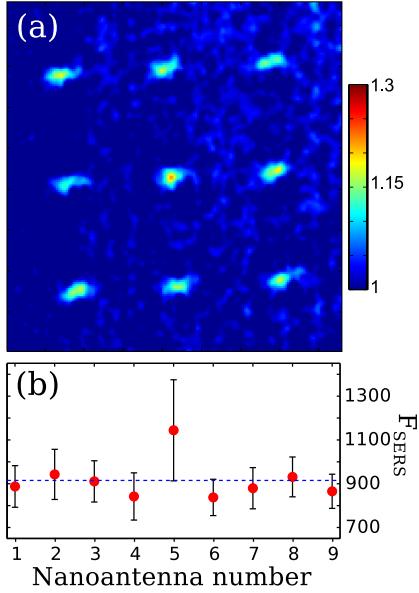


Figura 5.8: Intensidad Raman e intensificación SERS. (a) Mapa de intensidad Raman I_R de moléculas de PMMA en film, luego del proceso de normalización y de un filtro Gaussiano (5x5 px) para suavizar la imagen. Se observa un valor máximo de intensificación de 1,3. (b) Valor de intensificación para SERS, F_{SERS} obtenido para cada antena individual, que alcanza valores de 10^3 . En línea punteada se muestra el valor esperado, calculado como $(E/E_0)^4$.

Luego, se normaliza cada imagen SERS por el valor de intensidad afuera de las antenas para luego dividir píxel a píxel la imagen en resonancia por la tomada con $\lambda = 810$ nm. Así se obtiene un mapa de intensidad Raman I_R sin artefactos debido a la variación de moléculas en el volumen de detección. En la figura 5.8 (a) se muestra el mapa obtenido luego de la normalización, que vale uno donde no hay nanoantenas y alcanza un valor máximo de 1,3 en la antena central. Para cuantificar la intensificación alcanzada por estas antenas se calculó el valor experimental de la intensificación de la señal Raman, F_{SERS} , tomando el valor máximo de intensidad Raman sobre cada nanoantena, I_R^{MAX} y normalizando por el volumen del gap, según:

$$F_{SERS} = I_R^{MAX} \left(\frac{V_{spot} - V_{antena}}{V_{gap}} \right), \quad (5.1)$$

donde V_{spot} , V_{antena} y V_{gap} son los volúmenes de detección, de la antena y del gap, respectivamente. Cabe aclarar que para el volumen del gap se tomó un rectángulo de 20 x 20 x h_{antena} , con la altura de la antena, $h_{antena} = 200$ nm y para V_{spot} se tomó el ancho altura mitad de la PSF en la dirección lateral y 200 nm de alto, debido a que solo hay moléculas contribuyendo a la señal en el film polimérico.

Esta normalización está justificada pues la señal cuando se mide sobre la nanoantena tendrá su contribución más importante debido a las moléculas que se encuentran en el *gap*, pues son las que “sienten” el campo eléctrico más intenso [Le Ru y Etchegoin, 2012]. Los resultados para cada nanoantena individual se muestran en la figura 5.8 junto con la el valor esperado teóricamente, $(E/E_0)^4$ [Le Ru y Etchegoin, 2008], extraído de la distribución de

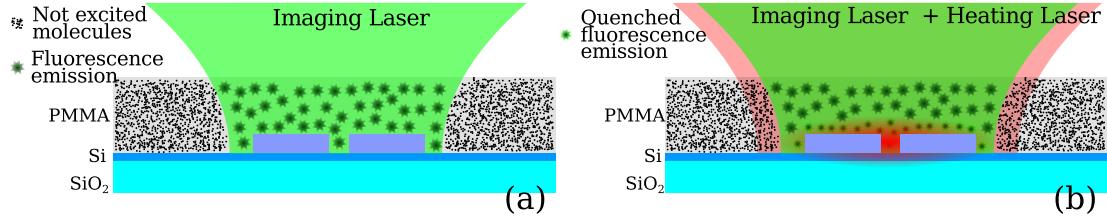


Figura 5.9: Esquema de funcionamiento del mapeo térmico. (a) Situación de imagen de referencia. Se utiliza un láser de baja potencia para realizar imágenes de fluorescencia sobre la muestra que contiene las nanoantenas. (b) Se repite la imagen pero con un láser de calentamiento en simultáneo. Las nanoantenas absorben esta energía y parte la transforman en calor. Las moléculas que se ven afectadas por este aumento de temperatura cambian su emisión, resultando en un cambio en la señal de fluorescencia detectada.

campo cercano en la figura 5.5. Se observa una buena coincidencia entre el valor esperado teóricamente y el experimental.

Los resultados presentados demuestran que las nanoestructuras dieléctricas se comportan como nanoantenas, es decir, son capaces de intensificar el campo electromagnético y concentrarlo en *hot spots* de dimensiones nanométricas, con valores de intensificación de 5,5. Además, se demostró que pueden ser utilizadas como una plataforma eficiente para experimentos de SERS, alcanzando un valor de 10^3 para F_{SERS} .

5.2.4. Método de mapeo térmico

Para el estudio de la temperatura que alcanzan las nanoantenas cuando se las ilumina en resonancia, se implementó el método de mapeo térmico basado en fluorescencia que se describe a continuación.

El método consiste en medir la intensidad de fluorescencia de sondas fluorescentes embebidas en una matriz polimérica alrededor de las nanoantenas mientras se las ilumina con luz resonante. Al elevar su temperatura las moléculas emitirán menos fluorescencia, lo que se verá traducido en un cambio de intensidad de fluorescencia detectada. Para esto se utiliza el microscopio confocal de doble haz presentado en el capítulo 4.

En la figura 5.9 se muestra un esquema del método, que requiere recubrir la muestra con un film polimérico embebido de moléculas fluorescentes (representadas como puntos). En primer lugar se toma una imagen de fluorescencia únicamente con el láser de imagen (figura 5.9 (a)), que se utiliza como referencia. Luego se toma una segunda imagen con el láser de calentamiento encendido, que es resonante con la nanoestructura. La nanoestructura absorbe parte de la energía entregada por el láser de calentamiento y la transforma en calor, elevando su temperatura (que termaliza rápidamente). Este aumento de temperatura, representado en la figura 5.9 (b) con un color rojo alrededor de la estructura, es sentido por las moléculas cercanas que emitirán menos (estrellas pequeñas en el esquema), lo que se traducirá en una reducción de la fluorescencia detectada. Este cambio en la fluorescencia detectada puede ser transformado a un valor de temperatura con la debida calibración, lo que da acceso a un valor de temperatura local en la muestra.

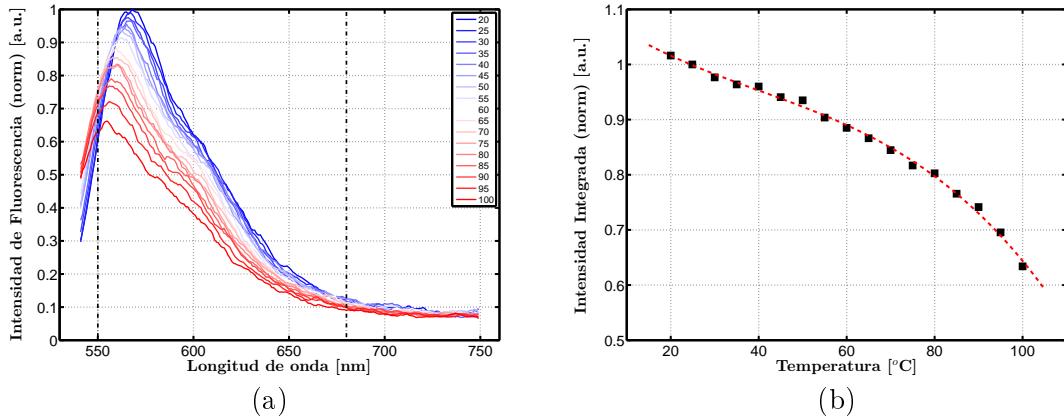


Figura 5.10: Intensidad de fluorescencia del NR para distintas temperaturas. (a) Espectros de emisión para el fluorósforo *Nile Red* a distintas temperaturas. Se observa cómo el pico de emisión se corre hacia el azul y la intensidad total de emisión disminuye al aumentar la temperatura. Las líneas verticales negras marcan la banda de detección, 550-680 nm. (b) Intensidad integrada en la banda de detección en función de la temperatura. La línea punteada corresponde al ajuste de los datos experimentales.

Cabe notar que el valor de temperatura será un valor medio, T , pues en la detección se suma la intensidad de todas las moléculas presentes en el volumen de detección y algunas pueden no estar afectadas por el calor generado (estrellas grandes en la figura 5.9 (b)). Por lo tanto, la resolución espacial de este método está limitada a la resolución espacial de la imagen de fluorescencia, cercana a 400 nm.

Se utiliza como sonda fluorescente la molécula *Nile Red* (NR), *9-diethylamino-5-benzo[α]phenoxyazinone*, que fue presentada en el capítulo 2. Se trata de un fluorósforo de alta eficiencia cuántica y fotoestabilidad, que se usa ampliamente debido a su sensibilidad a la polaridad del medio, incluyendo films poliméricos [Hou *et al.*, 2000]. Como se mencionó anteriormente, para inferir la temperatura de la muestra a partir de las medidas de intensidad de fluorescencia es necesario realizar una calibración que relacione estas dos magnitudes. Para ello se realizaron calibraciones en solución de NR con la ayuda de un fluorímetro comercial (*Quantamaster 400* de la compañía *Photon Technology International (PTI)*), que consta con un sistema para controlar la temperatura de la solución a medir (*TLC 50 Temperature Controlled Cuvette Holder for Fluorescence* fabricado por *Quantum Northwest*). Para obtener los espectros se fijó la excitación en 532 nm con 1 nm de ancho y se realizaron sucesivos espectros para cada temperatura, que se muestran en la figura 5.10 (a). Al aumentar la temperatura, se puede observar que el pico de emisión se corre hacia el azul, fenómeno conocido como termocromismo, que se debe a la disminución de la polaridad del medio con la temperatura [Hagan *et al.*, 1987]. Además, la intensidad total baja cuando aumenta la temperatura, debido a la activación de canales no radiativos de decaimiento que están relacionados con la agitación térmica (colisiones con moléculas del solvente, vibraciones intramoléculares y rotaciones) [Valeur, 2001; Cap. 3].

Utilizando los espectros de la figura 5.10 (a) se calculó la dependencia con la temperatura de la intensidad integrada en el rango de detección del microscopio, 550 – 680 nm, y se ajustó esa dependencia con un polinomio de tercer orden, que se muestra junto con los datos en la figura 5.10 (b). Se puede observar que la sensibilidad que provee este fluorósforo en este rango de detección $\sim 0,3\%/\text{C}^\circ$, comparable con otros métodos para medir

Capítulo 5. Aplicaciones a la nanoplasmónica

temperatura basados en intensidad de fluorescencia [Iwai *et al.*, 2005; Barja *et al.*, 2013].

El procedimiento para el mapeo térmico comienza con la preparación de la muestra. Las muestras son cubiertas completamente por una matriz polimérica de PMMA con sondas fluorescentes embebidas, como se mencionó anteriormente. Para eso se disuelve el polímero en anisol (950 PMMA A, MicroChem) y se mezcla con NR (Sigma Aldrich) para llegar a una concentración final de $40\text{ }\mu\text{M}$. Esta concentración fue elegida después de realizar experimentos de medición de tiempo de vida de fluorescencia en estos films para asegurar que no hay efectos de disminución de intensidad por concentración (*concentration quenching*). Para depositar el polímero en la muestra se utilizó el método de *spin-coating*, a 3500 revoluciones por minuto durante un minuto y luego se llevó la muestra a 160°C por 5 minutos. Este procedimiento genera films altamente homogéneos de 200 nm de grosor [Araoz, 2012]. La homogeneidad fue comprobada realizando imágenes de fluorescencia en distintos lugares de la muestra, que arrojaron los mismos valores de intensidad. También se realizó una calibración *in situ* de la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura para un film, obteniéndose una curva coincidente con la de la figura 5.10 (b), pero que tenía una cantidad menor de puntos, por lo que se utilizó directamente la que muestra la figura.

Una vez preparada la muestra, el experimento de mapeo térmico consiste en realizar una primer imagen de fluorescencia, solo con el láser de imagen, que oficia de referencia. Luego se realiza una imagen con ambos láseres incidiendo en la muestra, de la cual se inferirá la temperatura. Finalmente se realiza una tercer imagen de control únicamente con el láser de imagen, para asegurar la reversibilidad del proceso. Esta secuencia se repite para distintas intensidades del láser de calentamiento, I_h . Los efectos de fotoblanqueo son corregidos globalmente, ajustando una exponencial decreciente a la intensidad media de todas las imágenes ordenadas cronológicamente.

Las imágenes son tomadas en un área de $15 \times 15\text{ }\mu\text{m}$, con un tamaño de píxel de $75 \times 75\text{ nm}$ y un tiempo de integración de $4\text{ ms}/\text{px}$, con sólo $11\text{ }\mu\text{W}$ de potencia del láser de imagen llegando a la muestra, que es 3 órdenes de magnitud menor que lo utilizado para el láser de calentamiento, lo que permite despreciar el posible calentamiento generado por este láser. Se eligió esa área para tener en una misma imagen todas las nanoantenas fabricadas en las mismas condiciones: 9 para el Si y 25 antenas para el Au (ver el panel superior de la figura 5.11).

En la figura 5.11 se muestran las imágenes de fluorescencia resultantes del experimento, para ambas nanoantenas. Se trabajó con el láser de calentamiento en resonancia con las nanoantenas de silicio y las de oro, en $\lambda_h = 860\text{ nm}$. En las imágenes de referencia se puede notar un aumento de la fluorescencia sobre las nanoantenas de Si mientras que se observa una disminución en el caso del oro. Este comportamiento remarcable, que representa una diferencia importante entre estas estructuras, se discutirá más adelante, en la sección 5.2.6. Las imágenes (c) y (g) de la figura 5.11 fueron obtenidas con los dos láseres simultáneamente iluminando la muestra, $I_h = 6\text{ mW}/\mu\text{m}^2$, para silicio y oro, respectivamente. Se puede observar que la intensidad permanece constante para el caso del silicio mientras que decae notablemente para el caso del oro. Esta caída de intensidad se debe a un aumento en la temperatura, que será traducido a un valor en $^\circ\text{C}$ utilizando la curva de calibración de la figura 5.10 (b). Por último, en el panel inferior se muestran perfiles de intensidad correspondientes a las líneas marcadas en cada imagen, donde se evidencia la mencionada caída de intensidad en el caso del oro.

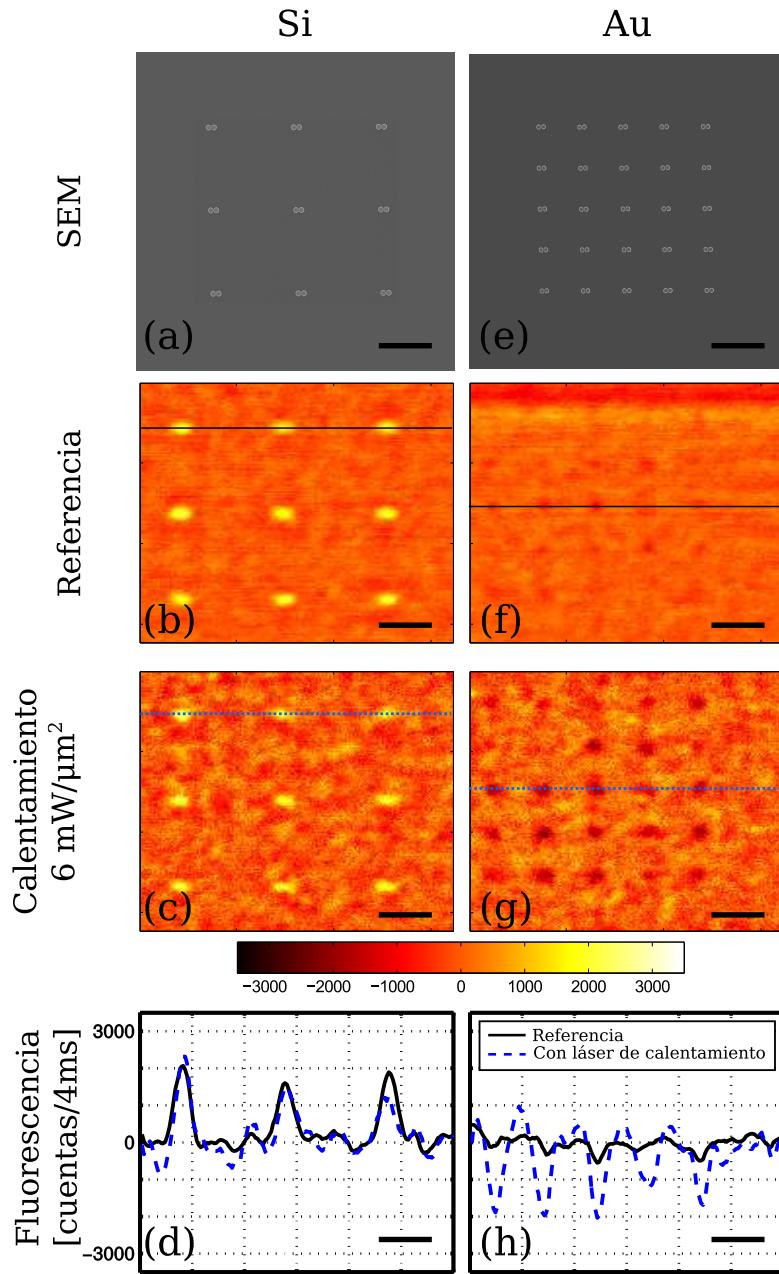


Figura 5.11: Imágenes de fluorescencia para el mapeo térmico. En la columna de la izquierda se muestran los resultados para silicio y en la derecha para oro. El panel superior muestra las imágenes SEM de las nanoantenas (a) Si y (b) Au. El panel de referencia muestra la imagen de fluorescencia inicial en el caso de (b) Si y (f) Au. Se observa un aumento de intensidad en Si y una disminución en el caso del oro. Panel calentamiento: Imágenes de fluorescencia con el láser de calentamiento a una intensidad de $6 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$, donde se aprecia cómo la intensidad se mantuvo para el silicio (c) y bajó notablemente para el oro (g). Panel inferior: perfiles de intensidad extraídos de las líneas marcadas en las imágenes, donde se evidencia la disminución de intensidad en el caso del oro. Todas las barras de escala representan $2 \mu\text{m}$ y a todas las imágenes de fluorescencia se les restó la intensidad promedio.

Una vez obtenidas las imágenes de fluorescencia y corregido el fotoblanqueo, se calcula para cada imagen la intensidad media en cada nanoantena I_{na} , realizando un promedio en un área circular de 5 px de radio, centrada en la posición de la nanoestructura. De manera similar, la intensidad de fondo I_{BG} (afuera de la nanoestructura) se calcula promediando la intensidad en un anillo de radio menor 6 px y radio mayor 8 px, con el mismo centro. Tanto la intensidad sobre la nanoantena como la de fondo dependen de la intensidad incidente del láser de calentamiento, ya que a mayor intensidad de láser se obtiene mayor calentamiento y por lo tanto, menor intensidad. Con todos estos elementos se puede calcular la intensidad corregida, I_{corr} según

$$I_{corr} = \frac{I_{na}(I_h)}{I_{na}(0)} - \frac{I_{BG}(I_h)}{I_{BG}(0)} + 1 \quad (5.2)$$

donde la $I_h = 0$ corresponde a la imagen de referencia. De esta manera se obtiene una intensidad que solo refleja el cambio debido a temperatura generada en la nanoantena. Luego, I_{corr} será traducida a un valor de temperatura con la curva de calibración (figura 5.10 (b)).

5.2.5. Calentamiento ultra-bajo de las antenas no plasmónicas

Utilizando el método presentado se estudió la temperatura local alrededor de las nanoantenas inducidas por la incidencia de un láser resonante. Como se dijo anteriormente, la temperatura obtenida con el método corresponde al valor promediado en el volumen de detección.

En la figura 5.12 se muestran gráficos de “caja” con los resultados de T para las antenas de Si (a) y Au (b), en función de la potencia del láser de calentamiento I_h (se tuvo en cuenta solo la intensidad del campo en la dirección paralela a las nanoantenas, ya que la polarización incidente en la muestra es circular para el láser de calentamiento). En cada caja de la figura, la marca roja central corresponde a la mediana del conjunto de 9 (25) estructuras de Si (Au); los bordes de recuadro azul representan el percentil 25^{to} y 75^{to} y las líneas se extienden hasta los valores más extremos que no son considerados *outliers*²[MathWorks, 2015]. Se puede notar que para las nanoantenas de silicio la temperatura se mantiene constante mientras que para las de oro aumenta del orden de 20 C°.

En los recuadros en las figuras se puede ver la distribución de temperatura alrededor de las estructuras, calculadas a partir de la resolución numérica de la ecuación del calor, como se presentó recientemente [Albella *et al.*, 2014; Caldarola *et al.*, 2015]. Notar que para el caso del oro, la máxima temperatura se encuentra en las vecindades nanométricas de la nanoantena mientras que en zonas alejadas disminuye unos $\sim 15\text{C}^\circ$. Esta distribución espacial debe ser tenida en cuenta para obtener la temperatura en el *gap*, T_g , que es la temperatura relevante para un experimento de SERS como el presentado anteriormente, debido a que las moléculas que contribuyen primordialmente a la señal se encuentran ubicadas allí.

Por lo tanto, para obtener la temperatura en el *gap* se calculó el valor medio de temperatura en el volumen de detección³, utilizando la distribución de temperaturas tridimen-

²Se considera *outlier* a un dato cuando es mayor que $q_3 + 1,5(q_3 - q_1)$ o menor que $q_1 - 1,5(q_3 - q_1)$, donde q_1 y q_3 son los percentiles 25^{to} y 75^{to}, respectivamente.

³Se tomó como volumen de detección un cilindro de 400 nm de diámetro y 200 nm de alto, pues las moléculas fluorescentes detectadas provienen de ese volumen.

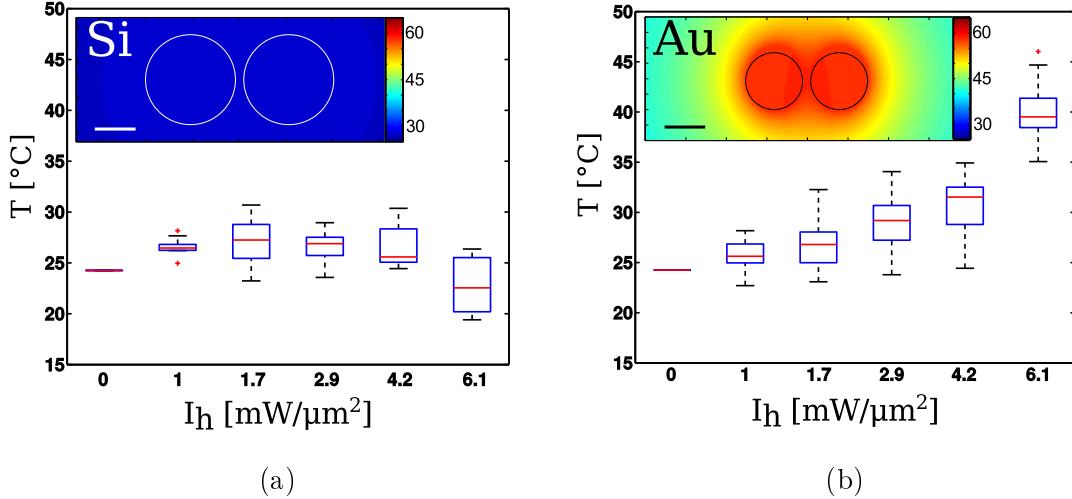


Figura 5.12: Medidas de temperatura media en las nanoantenas. Gráfico de cajas para la temperatura media T en las nanoantenas de (a)Si y (b)Au, excitadas en resonancia, en función de la intensidad del láser de calentamiento I_h . Se puede ver que la mediana de la temperatura se mantiene constante para el caso del silicio mientras que para el oro aumenta hasta 40C°. Los recuadros pequeños en cada gráfico muestran la distribución de temperaturas calculada numéricamente cuando se incide con una intensidad de 5 mW/ μm². Barra de escala: 100 nm. Notar que la temperatura en el *gap* alcanza 60 C° mientras que lejos de la estructura (pero dentro del *spot* láser) no supera los 45 C°.

sional calculada numéricamente. Así se obtuvo un factor de proporcionalidad que permite obtener la temperatura del *gap* a partir de la temperatura obtenida experimentalmente (para el oro el factor es 1.46 para Au y 1.05 para Si). En la figura 5.13 se muestran los resultados obtenidos para $\lambda_h = 860$ nm, para una nanoantena de Si y una de Au, en función de la intensidad del láser de calentamiento. También se muestra la predicción teórica para la temperatura del *gap*, que muestra una notable coincidencia con las mediciones. Como se esperaba, el incremento de temperatura para el caso del silicio es ultra-bajo, mientras que en el oro supera los 40C°.

Vale la pena mencionar que con la confianza ganada en las simulaciones numéricas que brinda la gran coincidencia observada, se calculó el aumento de temperatura para el caso de intensidades incidentes de 120 mW/ μm², obteniéndose valores mayores a 800C° para el oro y solo 70C° para el silicio. Esta gran diferencia en el comportamiento térmico entre los dos tipos de nanoantenas puede abrir la posibilidad de trabajar con nanoantenas de Si a intensidades donde las de Au se destruirían por completo [Kuhlicke *et al.*, 2013].

Adicionalmente se repitió el experimento completo de mapeo térmico para otras dos longitudes de onda de calentamiento, $\lambda_h = 880$ y 890 nm. Las temperaturas obtenidas para el *gap* se muestran en la figura 5.14, junto con la presentada anteriormente. Cualitativamente el resultado es el mismo: las nanoantenas de silicio mantienen su temperatura mientras que para el oro aumentan notablemente.

Para resumir, en esta sección se mostró experimental y teóricamente que las presentadas nanoantenas no plasmónicas fabricadas con silicio excitadas en resonancia no se calientan apreciablemente mientras que las de oro sí lo hacen, aún para intensidades bajas de calentamiento.

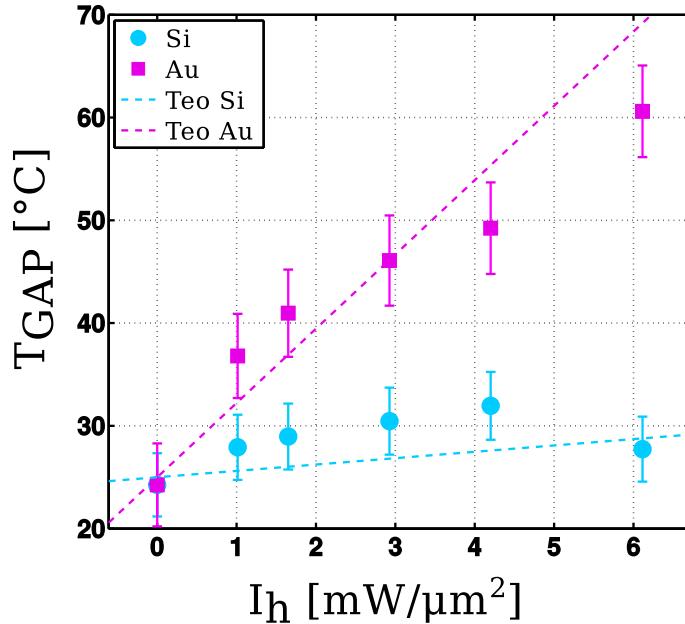


Figura 5.13: Temperatura de las nanoantenas en el gap. Los puntos representan las medias experimentales mientras que las líneas punteadas las predicciones teóricas. Se puede ver que para el caso del Si (cian) la temperatura aumenta levemente comparado con el caso del Au (magenta) que aumenta unos 40°C.

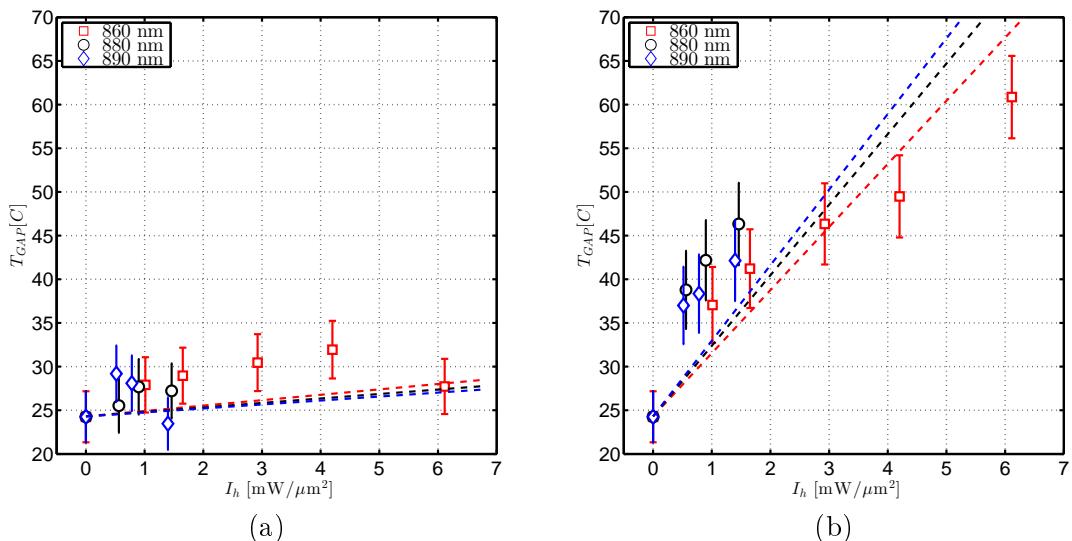


Figura 5.14: Temperatura de las nanoantenas en el gap a distintas λ_h . Los puntos representan las medidas experimentales mientras que las líneas punteadas las predicciones teóricas, para cada longitud de onda. Se observa en todos los casos que la temperatura aumenta notablemente en el caso del oro mientras se mantiene prácticamente constante para el silicio.

5.2.6. Intensificación de fluorescencia por superficie

En la sección 5.2.3 se mostró que las nanoantenas de silicio son capaces de intensificar el efecto Raman. Sumado a esto, se observó en las imágenes de fluorescencia de la figura 5.11 (b) que la fluorescencia de las moléculas de NR sobre las nanoantenas se intensifica, en contraste con el llamado *quenching* producido por las nanoantenas de oro. Este fenómeno de aumento de emisión de fluorescencia se conoce como intensificación de fluorescencia por superficie (*Surface Enhanced Fluorescence*, SEF).

La intensificación de campo eléctrico en los *hot spots* lleva a un aumento en la tasa de absorción en las moléculas allí ubicadas. Sin embargo, la naturaleza de la emisión molecular en las vecindades de las estructuras es muy distinta para cada tipo de antenas. En general, la intensificación de fluorescencia depende de dos factores: el acoplamiento de la emisión de las moléculas con el modo radiativo de la nanoantena y la eficiencia de emisión radiativa de la molécula. Estos dos factores compiten con el acoplamiento de los modos no-radiativos, que contribuyen al *quenching* de la fluorescencia, efecto que aparece a través de la parte imaginaria de la constante dieléctrica (presente en metales). Como los dieléctricos presentan una constante dieléctrica real, no se observa el efecto para las antenas de silicio.

En un importante trabajo Anger *et al.* [2006] mostraron elegantemente las limitaciones SEF en nanopartículas metálicas debido el efecto de *quenching*, que depende fuertemente de la distancia entre el dipolo emisor y la estructura metálica. Es por eso que para trabajar con metales se suele utilizar una capa separadora entre la antena y el emisor, que evita el *quenching* y logra intensificar la fluorescencia, pero como consecuencia la señal de SERS disminuye pues la molécula no alcanza la zona de mayor intensificación de campo. Aquí se muestra que las nanoantenas de silicio solucionan este problema pues no inhiben la emisión de fluorescencia y permiten realizar SEF y SERS en la misma configuración.

Este fenómeno fue estudiado numéricamente con la colaboración de Pablo Albella, del grupo de nanofotónica del *Imperial College London*, experto en simulaciones numéricas para dispositivos nanofotónicos. Se coloca una molécula fluorescente de prueba en el centro del *gap* de ambas nanoantenas y se modela su momento dipolar de transición como un dipolo eléctrico ideal (análogamente a la presentada en [Albella *et al.*, 2013]), con una eficiencia cuántica del 100% y una tasa de decaimiento intrínseco Γ_0 . Se calcula la potencia irradiada por el sistema y la energía del dipolo disipada por pérdidas óhmicas. Estas cantidades, cuando son normalizadas por la emisión en ausencia de nanoantena dan lugar a la intensificación de la tasa de emisión radiativa, Γ_R/Γ_0 y de los procesos no-radiativos Γ_{NR}/Γ_0 . La eficiencia cuántica se define como $QE = \Gamma_R/(\Gamma_R + \Gamma_{NR})$. Se analizan por separado dos orientaciones para el dipolo ubicado en el *gap*: una perpendicular a la antena y otra paralela.

En la figura 5.15 se muestran los resultados obtenidos para un amplio rango de longitudes de onda, donde se observa un comportamiento netamente distinto en los dos tipos de nanoantenas. A pesar de tener intensificaciones radiativas similares, relativamente bajas, las contribuciones no radiativas son enormes en el caso del oro, debido a las pérdidas intrínsecas, en especial en la zona de emisión del fluorósforo *nile red* (560-620 nm).

Para estudiar este efecto de intensificación en detalle experimentalmente se obtuvo un mapa de SEF de moléculas de *Nile Red* embebidas en el film polimérico de PMMA, normalizando la imagen de referencia de la figura 5.11 (b) de manera análoga a lo realizado para la imagen de SERS (se normalizó con la imagen fuera de resonancia, que oficia de

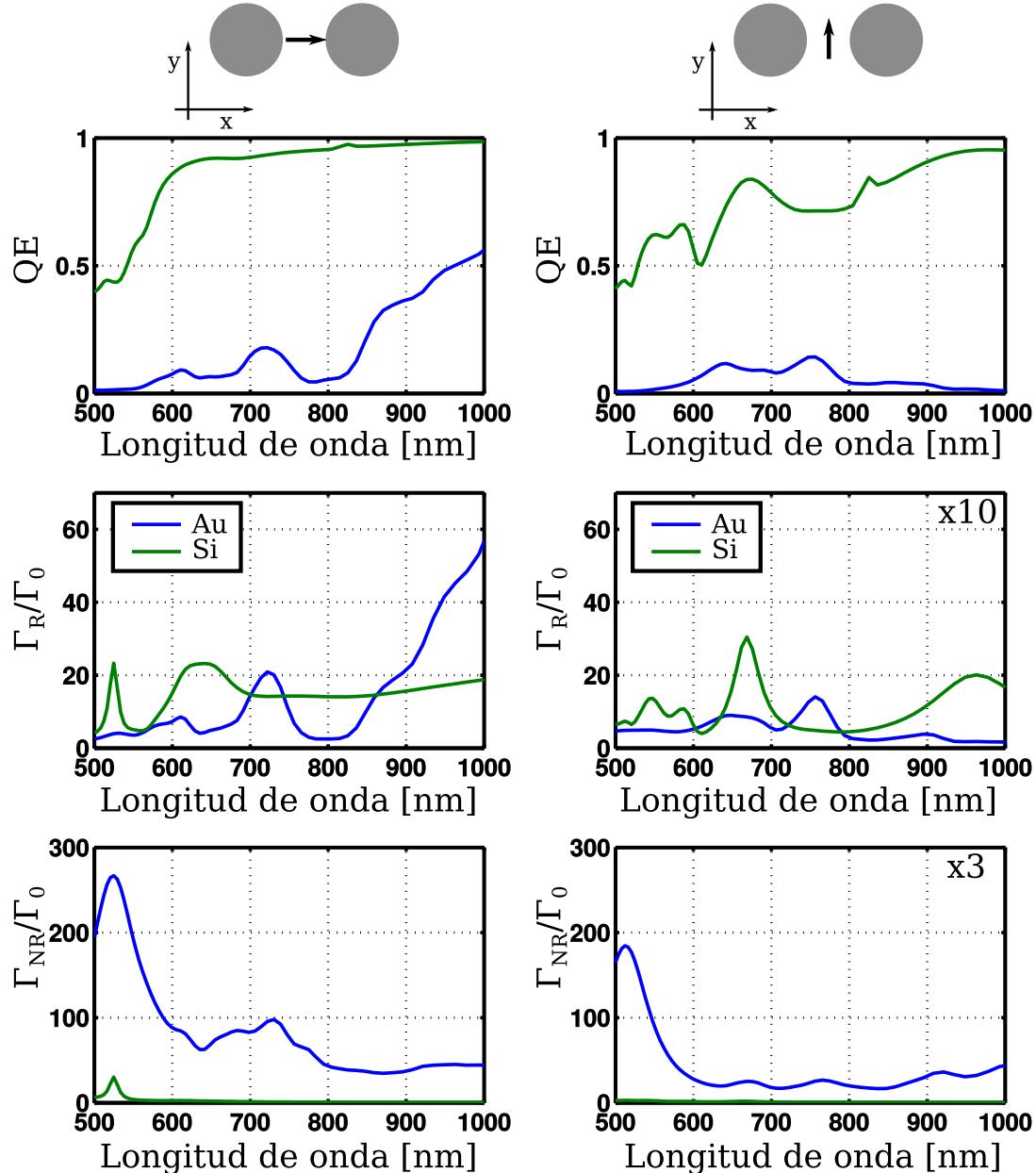


Figura 5.15: Propiedades de emisión en el *gap* de las nanoantenas. Cálculos numéricos para la eficiencia cuántica (QE), la tasa radiativa (Γ_R) y no radiativa (Γ_{NR}) de una molécula fluorescente en el *gap*, orientada como se muestra en el panel superior. Se observa una gran contribución no-radiativa en el caso del Au pero no en el caso del Si, para la zona de emisión del *nile red*. Se indica un factor de escala en los casos que fue necesario para mostrar las curvas.

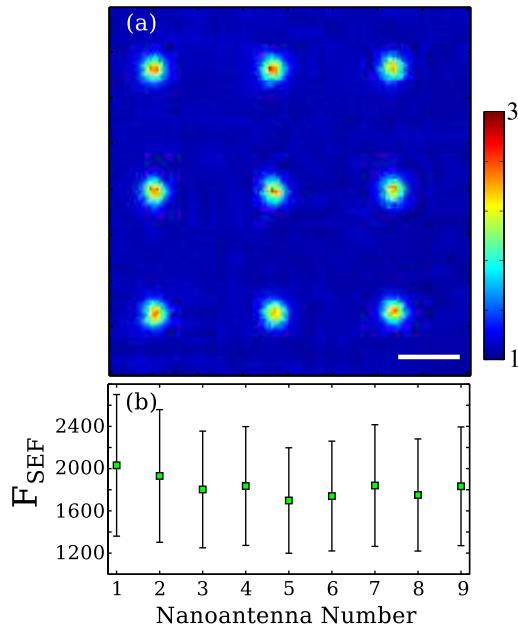


Figura 5.16: Mapa de SEF de moléculas de NR embebidas en un film de PMMA sobre nanoantenas de Silicio. (a) muestra el mapa de intensificación de fluorescencia. Barra de escala: 2 μm . (b) Factor de intensificación de fluorescencia, F_{SEF} para cada nanoantena, calculados a partir del máximo de (a) sobre cada nanoantena.

mapa de concentración). Luego se calculó el coeficiente SEF (F_{SEF}), asumiendo que las moléculas que contribuyen primordialmente a la señal están ubicadas en el gap (donde la intensidad de campo es mayor, según las simulaciones numéricas). Los resultados del mapa de SEF y de los valores de F_{SEF} , que se acercan al valor 1900 se muestran en la figura 5.16. Este notable comportamiento denota una diferencia importante entre las nanoantenas de Si y Au y muestra la posibilidad de diseñar experimentos de SEF más elaborados con nanoantenas dieléctricas que dan un buen valor de intensificación sin *quenching*.

5.2.7. Conclusiones

En conclusión, se presentó un novedoso tipo de nanoantenas de Si, formadas por dos discos separados 20 nm, que muestran razonables valores de intensificación de campo y logran confinar luz resonante en un *hot spot* de dimensiones nanométricas. Estas nanoantenas dieléctricas son capaces de intensificar el *scattering* Raman de un film polimérico en un factor $\sim 10^3$ y también intensifican la emisión de fluorescencia en un factor 1900, evitando el conocido *quenching* de la fluorescencia de moléculas cerca de metales.

Sumado a estas propiedades, mediciones térmicas locales probaron el calentamiento ultra-bajo que sufren estas nanoantenas cuando se las ilumina resonantemente, sorteando la principal desventaja de las nanoantenas metálicas tradicionales. La bajísima conversión de energía lumínica a calórica de estos dispositivos evita efectos no deseados de deformación o destrucción por temperatura, hecho que permitiría utilizarlo a altas intensidades. Esto representa una ventaja en diversas aplicaciones nanofotónicas como la generación de

Capítulo 5. Aplicaciones a la nanoplasmónica

armónicos superiores, nanoelectrónica o la detección ultrasensible de moléculas por espectroscopía. Estos resultados abren nuevas posibilidades de implementación de nanoantenas sin pérdidas, lo que constituye un paso importante en el área de la nanofotónica.

Capítulo 6

Microscopías no lineales: nuevas fuentes de luz

En este capítulo presenta una fuente de luz láser pulsada en el infrarrojo cercano, rápidamente sintonizable y robusta, basada en una fibra óptica de cristal fotónico (*Photonic Crystal Fibre*, PCF), que puede ser utilizada en microscopías no lineales. Se presenta el diseño y una exhaustiva caracterización de esta fuente, que demuestra que los pulsos generados no dependen de la dispersión de los pulsos a la entrada en el rango estudiado, lo que permite compactar la fuente y hacerla más atractiva a la hora de las aplicaciones a microscopías.

También se presenta la adaptación del microscopio confocal *home-made*, presentado en capítulos anteriores, para realizar imágenes de segunda armónica óptica (*Second Harmonic Generation*, SHG). Específicamente, se estudió la intensificación y eficiencia de generación de SHG de nanohilos de ZnO combinados con nanoantenas metálicas.

6.1. Introducción y motivaciones

Las microscopías ópticas lineales, incluida la microscopía confocal de fluorescencia, se basan en procesos mediados por un fotón, donde las interacciones entre la luz y la materia tienen una dependencia lineal con la intensidad incidente. En contraste, las microscopías ópticas no lineales utilizan interacciones no lineales entre la luz y la materia que involucran fenómenos multifotónicos, por lo que resultan inherentemente diferentes, brindando propiedades y capacidades únicas.

En óptica, la respuesta no lineal que se observa en distintos medios materiales ante la aplicación de un campo eléctrico externo, se explica utilizando el desarrollo de la polarización \mathbf{P} del material en potencias del campo eléctrico [Boyd, 2003]:

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \epsilon_0 (\chi^{(1)} \cdot \mathbf{E} + \chi^{(2)} : \mathbf{E}\mathbf{E} + \chi^{(3)} : \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots), \quad (6.1)$$

donde $\chi^{(j)}$ (tensor de rango $j + 1$) es la susceptibilidad de orden j , que da cuenta de la respuesta del medio frente al campo aplicado y ϵ_0 es la permeabilidad del vacío. En general las susceptibilidades dependen de la frecuencia del campo incidente y los efectos no lineales se explican utilizando los términos de orden 2 y superiores.

Entre todos los fenómenos no lineales utilizados como mecanismos para generar contraste y realizar imágenes se destacan la excitación por dos fotones (*Two-photon Excitation*, TPE), la generación de segunda armónica y la dispersión anti-Stokes Raman coherente (*Coherent anti-Stokes Raman Scattering*, CARS), cuyos diagramas de Jablonski se muestran en la figura 6.1.

La excitación de fluorescencia por dos fotones es un proceso no lineal en el que una molécula absorbe dos fotones de frecuencia ω_p en un mismo proceso cuántico y pasa así a un estado excitado, como se esquematiza en la figura 6.1 (a). Desde ese estado excitado relaja rápidamente hasta caer al estado S_1 , desde el cual vuelve al fundamental emitiendo un fotón a la frecuencia ω_f , de menor energía debido a que cierto estado vibracional fue excitado en el proceso [Zipfel *et al.*, 2003].

Por otro lado, la generación de segunda armónica es un proceso coherente en el que dos fotones de la misma energía $E_p = \hbar\omega_p$ interactúan en simultáneo con un material y se combinan para generar un fotón del doble de energía $E_f = \hbar\omega_f = 2E_p$. En la figura 6.1 (b) se esquematiza el proceso. Este fenómeno ocurre en materiales no centro-simétricos (i.e. que no tienen simetría de inversión), pues la presencia de esta simetría implica $\chi^{(2)} = 0$ [Boyd, 2003]. La eficiencia en la generación de segunda armónica es máxima cuando se cumple la llamada condición de *phase matching*, que dicta que la variación del vector de onda total del proceso debe ser nula: $\Delta\mathbf{k} = 2\mathbf{k}_p - \mathbf{k}_f = 0$, donde \mathbf{k}_p y \mathbf{k}_f representan a los vectores de onda del bombeo y de la segunda armónica generada, respectivamente.

CARS es un proceso de mezclado de cuatro ondas, donde un campo eléctrico de bombeo $E_p(\omega_p)$, un campo de Stokes $E_s(\omega_s)$, un campo de prueba $E'_p(\omega'_p)$ interactúan con una muestra y generan un campo anti-Stokes E_{as} a la frecuencia $\omega_{as} = \omega_p - \omega_s + \omega'_p$ [Cheng y Xie, 2004]. Debido a que se trata de un proceso coherente, la condición de *phase matching* debe cumplirse: $2\mathbf{k}_p = \mathbf{k}_{as} + \mathbf{k}_s$.

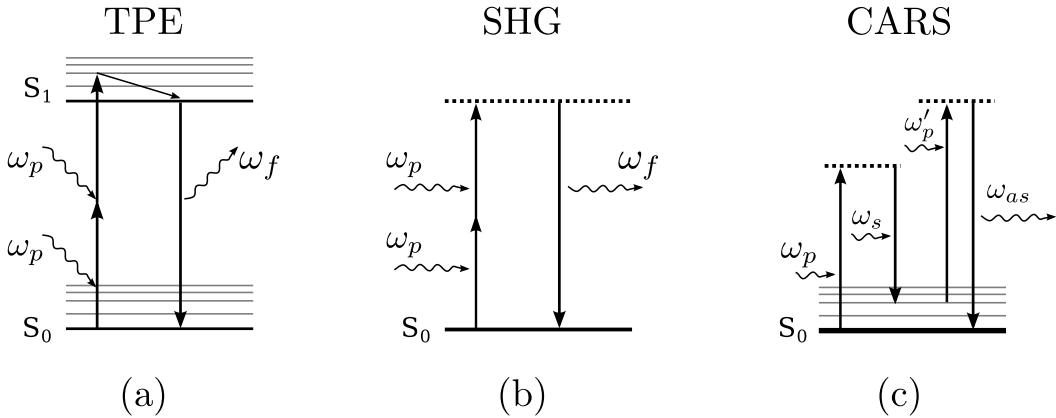


Figura 6.1: Diagramas de Jablonski de los efectos no lineales utilizados en microscopía. El valor de energía crece verticalmente y las líneas horizontales representan estados energéticos (punteadas: estados virtuales, grises: estados vibracionales). (a) TPE: Dos fotones de frecuencia ω_p son absorbidos simultáneamente para llevar al marcador fluorescente al estado excitado S_1 . Luego de una relajación vibracional la molécula vuelve al estado fundamental S_0 , emitiendo fluorescencia de a una frecuencia ω_f ($< 2\omega_p$). (b) SHG: Dos fotones interactúan simultáneamente con la muestra para generar un fotón del doble de la frecuencia inicial, $\omega_f = 2\omega_p$. Se trata de un proceso coherente. (c) CARS: Involucra 4 fotones, ω_p excita la molécula a un estado virtual y ω_s la lleva a un estado vibracional excitado. Un segundo fotón ω'_p la excita nuevamente y al decaer al estado fundamental S_0 emite un fotón en la frecuencia anti-Stokes ω_{as} .

6.1.1. Microscopías no lineales

En la TPEM se utiliza como mecanismo de contraste la fluorescencia de un marcador (puede ser un fluorósforo o una proteína fluorescente), valiéndose de la absorción “simultánea” (tiempos menores a 0,1 fs) de dos fotones de baja energía: la energía de cada uno por separado no es suficiente para provocar la transición pero al entregar su energía en el mismo proceso cuántico, la transición es posible. Este fenómeno de absorción simultánea de dos fotones había sido predicho teóricamente por María Göppert-Mayer [1931], en su tesis doctoral (Universidad de Göttingen, Alemania) y resulta tener una probabilidad de ocurrencia extremadamente baja; la sección eficaz de absorción de dos fotones $\sigma_{2p} = 0,1 - 100 \text{ GM}$, ($\text{GM} \equiv 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{s}$) [Svoboda y Yasuda, 2006]. Por eso, se utilizan láseres de pulsos ultracortos que proveen potencias pico altísimas para lograr señales medibles, sin dañar la muestra. Típicamente se utilizan láseres de Titanio Zafiro (Ti:Za) [Curley *et al.*, 1992; Zipfel *et al.*, 2003] que proveen pulsos de femtosegundos en el rango 700 – 1000 nm, ideal para la excitación por dos fotones de marcadores visibles.

Una notable ventaja de esta técnica reside en la baja fotodegradación, debido a que el fenómeno de absorción de dos fotones ocurre únicamente en la zona focal, donde la intensidad es suficientemente alta. Esto también provee la posibilidad del seccionamiento axial sin la necesidad de utilizar un *pinhole* confocal, lo que permite reconstrucciones tridimensionales de la muestra. Sumado a esto, posee una alta penetración en el tejido biológico pues en las longitudes de onda de excitación la absorción y el *scattering* son bajos, lo que lleva a su amplia implementación en problemas que requieran realizar imágenes dentro de tejidos gruesos [Theer *et al.*, 2003].

La microscopía de segunda armónica, que fue presentada por primera vez por Hellwarth y Christensen [1974], se ha hecho popular especialmente para el relevamiento de imágenes de materiales biológicos y más recientemente en nanofotónica [Huang y Cheng, 2013; Grange *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2007; Sanatinia *et al.*, 2014]. Con esta técnica se han estudiado proteínas estructurales, como el colágeno [Campagnola *et al.*, 2002], complejos de actomiosina y tubulina [Campagnola *et al.*, 2001]. La fundamental diferencia con TPEM, es en este caso no es necesario marcar la estructura a estudiar, sino que se utiliza la cualidad intrínseca de ciertos materiales para generar segunda armónica. Dado a que se trata de un fenómeno coherente, se conserva la información de la fase, lo que permite utilizar la técnica llamada anisotropía, para acceder a la información de orientación de las estructuras estudiadas. Cabe mencionar, que al igual que la absorción por dos fotones, la SHG depende cuadráticamente con la intensidad incidente, lo que permite el mencionado seccionamiento óptico y la posterior reconstrucción tridimensional de la muestra [Campagnola y Loew, 2003]. En cuanto a la instrumentación de esta técnica es similar a la de TPEM; se utilizan típicamente láseres de Ti:Za como fuente de pulsos ultracortos y microscopios de barrido de láser junto con detectores de fotones únicos.

Otra microscopía no lineal muy utilizada es la microscopía CARS, que fue presentada por primera vez por Duncan *et al.* [1982] y cobró gran interés en la comunidad científica a partir del trabajo pionero de Zumbusch *et al.* [1999] que mostró por primera vez seccionamiento tridimensional por con esta técnica. Se trata de un método que permite realizar imágenes con especificidad química, donde se utilizan un pulso de bombeo y otro llamado Stokes, que se superponen espacial y temporalmente para luego ser enfocados fuertemente ($\sim 1 \mu\text{m}^3$) en una muestra. El contraste en esta microscopía proviene de la intensificación de señal cuando la diferencia en frecuencia de los láseres de bombeo y de Stokes $\omega_s - \omega_p$ es sintonizada con una frecuencia vibracional Raman. La intensidad CARS depende cuadráticamente con la intensidad del bombeo y linealmente con la intensidad Stokes, hecho similar a la TPEM, lo que permite el mencionado seccionamiento 3D [Cheng y Xie, 2004]. Una importante ventaja de esta técnica reside en que la señal se encuentra corrida hacia el azul respecto de las frecuencias de excitación, lo que permite un fácil filtrado y su correcta detección aún en presencia de fluorescencia por absorción de un fotón.

En la tabla 6.1 se resumen las propiedades más importantes de cada microscopía, incluyendo las fuentes de luz más utilizadas para su implementación. Puede observarse que la utilización de láseres de pulsos ultracortos, es decir en el rango de los ps o fs es un común denominador en estas técnicas, ya que para observar los fenómenos no lineales se necesitan intensidades altas.

6.1.2. Fuentes de luz alternativas para microscopías no lineales: PCFs

En 1996 fueron presentadas por primera vez las **fibras ópticas de cristal fotónico** (PCF), como una excelente guía de onda (monomodo) en un amplio rango espectral, 458-1550 nm y bajas pérdidas [Knight *et al.*, 1996]. El novedoso diseño consistía en un núcleo de sílice rodeado de un cristal fotónico de sílice (SiO_2) y aire con simetría exagonal, que fue utilizado en diversas oportunidades en años siguientes.

Sumado a la mencionada posibilidad de mantener un perfil monomodo en un amplio rango espectral, las PCF proveen un gran confinamiento espacial, lo que lleva a un alto coeficiente no lineal γ y la posibilidad de manipular los parámetros de fabricación para obtener el perfil de dispersión deseado [Dudley, 2006]. Estos factores combinados hacen de las

6.1. Introducción y motivaciones

Propiedad	TPE	SHG	CARS
Primer demostración	Denk <i>et al.</i> [1990]	Hellwarth y Christensen [1974]	Duncan <i>et al.</i> [1982]
Susceptibilidad involucrada en el proceso	$\chi^{(3)}$	$\chi^{(2)}$	$\chi^{(3)}$
Ventajas	Gran penetración en tejido vivo. Fotodegradación disminuida debido a la localización espacial intrínseca de la excitación	Proceso coherente, sin necesidad de marcado, con reglas de selección debido a la simetría. Da información de la orientación de las estructuras.	Proceso coherente. Contraste inherente debido a las vibraciones moleculares: no necesita marcado. Selectividad química y vibracional.
Fuentes de luz utilizadas	Ti:Za sintonizable	Ti:Za sintonizable	Ti:Za de picosegundos, OPO, ND:Vanadato (164 nm)

Tabla 6.1: Propiedades más relevantes de las microscopías no lineales presentadas. Modificado de [Fu y Gu, 2007].

PCF una herramienta altamente atractiva para la comunidad científica, que dio lugar una nueva generación de fuentes de luz altamente brillantes y de gran ancho espectral, basadas en el fenómeno conocido como **generación de supercontinuo** (SC) [Ranka *et al.*, 2000; Russell, 2003]. Actualmente este tipo de PCF se encuentran disponibles comercialmente¹, así como los láseres supercontinuos [Savage, 2009], lo que facilita su utilización en diversas aplicaciones, como microscopías ópticas, espectroscopías y nanofotónica.

Este tipo de fuentes novedosas ha sido utilizada para microscopías no lineales: para microscopía de dos fotones [McConnell y Riis, 2004; Palero *et al.*, 2005; Isobe *et al.*, 2005; Unruh *et al.*, 2006] y microscopía CARS [Kano y Hamaguchi, 2005, 2006; Vacano *et al.*, 2006; Zheltikov, 2007], entre otras técnicas.

En el caso de TPEM, McConnell y Riis [2004] utilizan una PCF y un cristal doblador para generar pulsos ultracortos en 665 nm para realizar imágenes de fluorescencia a baja longitud de onda en células cardíacas y musculares, marcadas con el indicador de calcio fluorescente fura-2/AM. En este diseño la utilización de la PCF fue clave en para obtener un esquema compacto y robusto, que permitía seleccionar la longitud de onda en el rango 546 – 687 nm. Por otra parte, Isobe *et al.* [2005] utiliza un espectro ultra-ancho generado en una PCF para realizar imágenes de TPE multicolores simultáneamente: excita la muestra con el espectro ancho y separa espectralmente los distintos canales en la detección con filtros espectrales adecuados. Con esta configuración realizaron imágenes simultáneas en tres colores de células de arteria pulmonar bobina fijadas.

En el caso de CARS, en el trabajo de Kano y Hamaguchi [2005] se utiliza un láser de femtosegundos como bombeo (ω_p) y para alimentar la PCF, que genera pulsos ultra-anchos. Estos pulsos se utilizan como anti-Stokes (ω_s) y generan un espectro Raman completo, adquirido con un espeñómetro. Con esta configuración se mostró el espectro Raman de

¹Uno de los más populares fabricantes es NKT Photonics Inc., <http://www.nktphotonics.com>.

un liposoma y se realizaron imágenes utilizando la vibración de estiramiento del enlace C-H. Luego, con esta misma configuración experimental se mostró la posibilidad realizar imágenes y espectros Raman de células de levaduras vivas [Kano y Hamaguchi, 2006]. Por otra parte, Zheltikov [2007] utilizó una rama solitónica infrarroja generada en una PCF como pulso de anti-Stokes para generar CARS en una celda de cloruro de carbono (CCl_4), en la configuración no colineal. Aquí se utilizaron las propiedades de sintonizabilidad de los solitones generados en fibras, lo que permitió sintonizar ω_s con una frecuencia vibracional de la muestra y así trabajar en resonancia.

El común denominador de estos ejemplos es la utilización de novedosas fuentes de luz para ampliar las capacidades de las microscopías no lineales. La fuente desarrollada en esta tesis pretende continuar en esta dirección, agregando la posibilidad de sintonizar rápidamente la longitud de onda de pulsos ultracortos en el infrarrojo cercano, lo que permitiría multiplexar la excitación de cualquiera de las mencionadas microscopías. Lo más notable de esta fuente es que en ese proceso de sintonización, únicamente se está cambiando la longitud de onda, pues se mostrará experimental y teóricamente que los pulsos mantienen su ancho espectral y temporal en todo el rango. Sumado a esto se muestra que esta notable propiedad no depende del *chirp* (barrido temporal de la frecuencia) de los pulsos de bombeo, lo que permite compactar la fuente y le da una gran fiabilidad.

6.2. Desarrollo de una nueva fuente de luz rápidamente sintonizable para microscopías no lineales

La propagación de **solitones ópticos** en fibras ha sido utilizado como una solución compacta para una fuente de luz sintonizable de pulsos ultra cortos [Nishizawa y Goto, 1999; Abedin y Kubota, 2004; Lee *et al.*, 2008]. La formación de solitones ópticos en fibras ópticas se da cuando el *chirp* generado por el efecto no lineal conocido como automodulación de fase (en inglés, *Self Phase Modulation*, SPM) es compensado con el *chirp* generado por la dispersión de la velocidad de grupo (en inglés *Group-Velocity Dispersion*, GVD) [Agrawal, 2007; Cap. 4].

A continuación se explicarán breve y cualitativamente estos dos fenómenos necesarios para comprender la formación de solitones en fibras ópticas y luego se comentará brevemente el llamado corrimiento espectral Raman, responsable de la sintonizabilidad de los solitones.

Dispersión de la velocidad de grupo (GVD)

Este fenómeno no es mas que la manifestación del conocido fenómeno de dispersión cromática. La dispersión cromática en cualquier material se debe a la dependencia del índice de refracción n con la frecuencia del campo electromagnético que suele ser modelado con la ecuación de Sellmeier [Marcuse, 1982; Cap.8 y 12]. La dispersión en las fibras ópticas juega un papel fundamental en la propagación de pulsos cortos, debido a que las distintas componentes espectrales que conforman el pulso viajan a distintas velocidades, dadas por $c/n(\omega)$, donde c es la velocidad de la luz en el vacío. Matemáticamente los efectos de la dis-

6.2. Desarrollo de una nueva fuente de luz rápidamente sintonizable para microscopías no lineales

persión en fibras ópticas se introducen al desarrollar en serie la constante de propagación² $\beta(\omega)$ alrededor de la frecuencia central ω :

$$\beta(\omega) = n(\omega) \frac{\omega}{c} = \beta_0 + \beta_1(\omega - \omega_0) + \frac{1}{2}\beta_2(\omega - \omega_0) + \dots, \quad (6.2)$$

donde los coeficientes son

$$\beta_m = \left(\frac{d^m \beta}{d\omega^m} \right)_{\omega=\omega_0} \quad (m = 0, 1, 2, \dots). \quad (6.3)$$

El parámetro β_1 es la inversa de la velocidad de grupo v_g , que es la velocidad a la que se propaga la envolvente de un pulso óptico al propagarse por la fibra. El parámetro β_2 (que suele describirse en ps^2/km) representa la dispersión de la velocidad de grupo y es el responsable del ensanchamiento temporal de los pulsos, debido las diversas componentes espectrales que lo conforman tienen distinta velocidad de propagación. Este fenómeno se conoce como dispersión de la velocidad de grupo (en inglés *Group-Velocity Dispersion*, GVD) [Agrawal, 2007] y β_2 es el parámetro GVD. Sin embargo, para el caso de fibras ópticas en la práctica se suele utilizar el parámetro de dispersión $D \equiv \frac{d\beta}{d\lambda}$ (en $\text{ps km}^{-1} \text{nm}^{-1}$), que se relaciona con β_2 según

$$D = -\frac{2\pi c}{\lambda^2} \beta_2 \quad (6.4)$$

La figura 6.2 (a) muestra el perfil de dispersión y la variación de β_2 con la longitud de onda para la fibra utilizada en la fuente de luz. Se puede ver que existe una longitud de onda para la cual la dispersión se anula, que se conoce como longitud de onda de dispersión nula y se nota λ_D . Si se propagaran pulsos cerca de esta longitud de onda se evidenciarían fenómenos de dispersión de tercer orden que tienen que ver con β_3 en el desarrollo 6.2. La existencia de λ_D define dos regímenes cualitativamente distintos en lo que respecta a la GVD: cuando $D < 0$ ($\beta_2 > 0$) se dice que la fibra presenta dispersión normal, caso en el que las componentes “azules” de un pulso que viaja en la fibra se propagan más despacio que las componentes “rojas” del mismo pulso, lo que lleva al ensanchamiento temporal del mismo. En contraste, el llamado régimen de dispersión anómala, ocurre el efecto contrario, ya que $\beta_2 < 0$ ($D > 0$): las componentes “azules” viajan más rápidamente que las “rojas”, lo que también lleva a un ensanchamiento temporal de los pulsos[Saleh y Teich, 1991; Cap. 5]. En la figura 6.2 (b) se muestra una imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM) obtenida por el fabricante.

Si se consideran solo los efectos de la GVD a segundo orden, es decir, se retienen hasta el segundo término del desarrollo 6.2, el ancho temporal de un pulso T de ancho inicial t_0 que se propaga una distancia z en una fibra óptica se puede calcular utilizando la fórmula

$$T(z) = \sqrt{t_0^2 + \left(\frac{|\beta_2| z}{t_0} \right)^2} \quad (6.5)$$

donde β_2 es el coeficiente de GVD correspondiente a la fibra. Cabe notar que el ensanchamiento depende del valor absoluto de β_2 y es mayor al aumentar la distancia propagada en la fibra.

²En el caso de ondas electromagnéticas se suele utilizar k para denominar a la constante de propagación. Sin embargo, en el área de fibras ópticas se suele utilizar β , por lo que se toma esta notación para este capítulo.

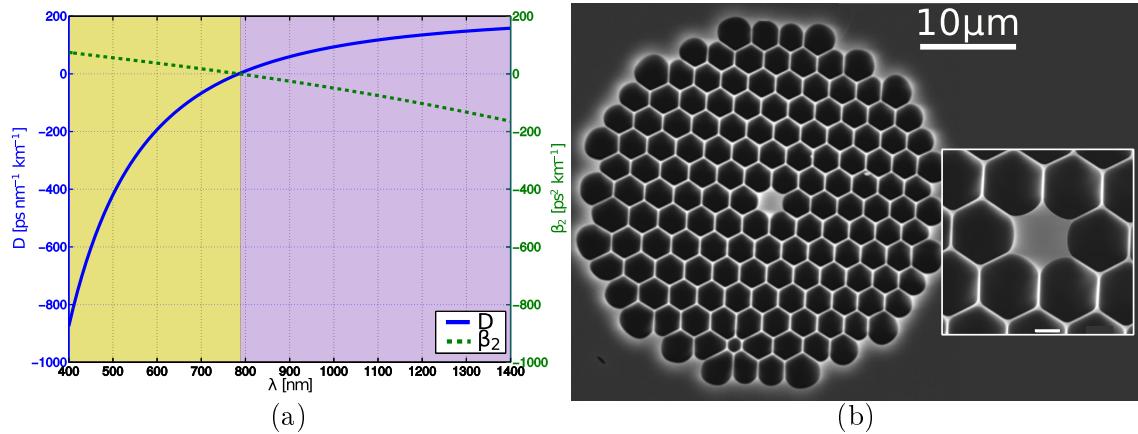


Figura 6.2: Dispersión de la fibra utilizada para la fuente de luz. Se trata de la fibra óptica NL-2.3-790-02 (Thorlabs). (a) Perfil de dispersión D y de β_2 , que se anulan en $\lambda_D = 790$ nm. En amarillo se marca la zona de dispersión normal, donde la dispersión es negativa ($\beta_2 > 0$) y en lila el régimen de dispersión anómala ($\beta_2 < 0$). (b) Micrografía de microscopio electrónico de barrido del núcleo de la fibra, donde puede verse claramente la microestructura que forma el cristal fotónico. En el recuadro pequeño se muestra un acercamiento del núcleo de la fibra (barra $\equiv 1 \mu\text{m}$).

Automodulación de fase (SPM)

Este efecto es una manifestación de la dependencia del índice de refracción con la intensidad, que se da en medios ópticos no lineales, y conlleva al ensanchamiento espectral de pulsos ópticos, observado por primera vez en fibras ópticas por Ippen *et al.* [1974] y estudiado sistemáticamente por Stolen y Lin [1978]. Es el análogo temporal al efecto Kerr que lleva al fenómeno de autoenfoque en un medio no lineal cuyo $n_2 > 0$ [Agrawal, 2007; Cap. 4].

La automodulación de fase induce una dependencia temporal de la fase del pulso proporcional a la derivada temporal de intensidad de pulso, lo que significa que se inducen cambios espectrales, ya que una fase dependiente del tiempo implica que la frecuencia óptica instantánea difiere a lo largo del pulso de su frecuencia central ω_0 .

Si solo se tiene en cuenta el fenómeno de automodulación de fase, al propagar un pulso corto por una fibra se encuentra que el mismo sufre un ensanchamiento espectral como el que se esquematiza en la figura 6.3. Un perfil temporal gaussiano genera las frecuencias que se muestran en la figura (en amplitudes arbitrarias, solo para ilustrar) a través del fenómeno de automodulación de fase. Observar que en el tren trasero del pulso se generan frecuencias menores a la central, es decir, corridas hacia el rojo, mientras en el tren delantero se generan frecuencias mayores, corridas hacia el azul.

Formación de solitones ópticos

Como se mencionó anteriormente, la formación de solitones ópticos se debe a la precisa combinación de los dos fenómenos presentados anteriormente. La automodulación de fase genera nuevas componentes espectrales corridas al rojo en el tren trasero del pulso mientras genera nuevas componentes corridas al azul en el tren delantero. Si además se

6.2. Desarrollo de una nueva fuente de luz rápidamente sintonizable para microscopías no lineales

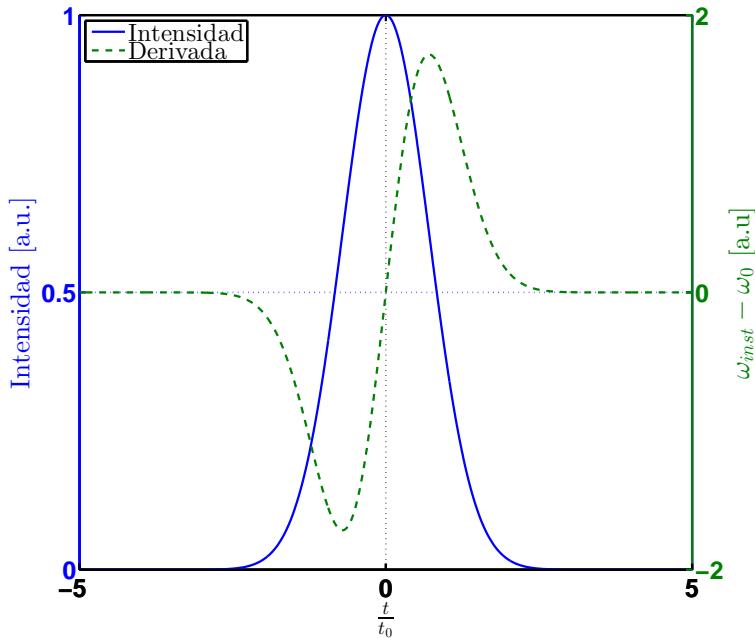


Figura 6.3: Ilustración del fenómeno de automodulación de fase. A modo ilustrativo, se muestra un pulso con forma gaussiana (línea llena azul) y su derivada temporal (línea punteada verde), que resulta proporcional a las nuevas frecuencias generadas por SPM. Notar que se generan frecuencias mayores a ω_0 en el tren delantero del pulso y menores en el tren trasero.

tiene en cuenta la dispersión de la velocidad de grupo, en el caso de dispersión normal, las nuevas componentes rojas en el tren trasero del pulso viajan más lentamente que las nuevas componentes azules en el tren delantero, lo que lleva al ensanchamiento indefinido del pulso: las componentes que están adelante viajan más rápido y las que están atrás más lento. La situación es distinta en el caso de dispersión anómala, pues las componentes rojas generadas en el tren trasero del pulso viajan a mayor velocidad que las azules generadas en el tren delantero, lo que hace que el pulso se mantenga. En otras palabras, el *chirp* inducido por SPM se cancela con el inducido por la GVD.

Existe una forma de pulso particular en la que esta cancelación es perfecta, la secante hiperbólica, y por lo tanto, pulsos con esta dependencia temporal pueden propagarse a lo largo de la fibra sin deformarse. Si un pulso tiene una forma distinta, a lo largo de la propagación cambiará de forma hasta lograr una cancelación perfecta, es decir, hasta lograr la forma de secante hiperbólica [Agrawal, 2007]. Esta solución estable al problema de propagación de pulsos ultracortos en fibras ópticas corresponde a los **solitones ópticos**.

Se puede mostrar que esta forma temporal es una solución exacta de la ecuación de propagación de pulsos en fibras ópticas cuando se tiene en cuenta la dispersión de la velocidad de grupo y la automodulación de fase, con el llamado orden del solitón N igual a 1:

$$N^2 = 1 = \frac{\gamma P_0 T_0^2}{|\beta_2|}, \quad (6.6)$$

donde γ es el coeficiente no lineal de la fibra, P_0 la potencia pico y T_0 el ancho temporal. Esta ecuación impone una potencia mínima necesaria para formar un solitón fundamental

$(N = 1)$.

La posibilidad de formar solitones ópticos en fibras había sido sugerida en 1973 [Hasegawa y Tappert, 1973], pero recién fueron observados en 1980 [Mollenauer *et al.*, 1980], utilizando pulsos de ~ 7 ps en $\lambda = 1550$ nm. En este experimento se mostró la existencia de solitones ópticos fundamentales a una potencia $P_0 = 1,2$ W, que se acerca bastante al valor esperado utilizando 6.6, $P_0 = 1$ W.

Otros efectos no lineales: efecto Raman

Existen otros efectos no lineales que afectan a los solitones que se propagan en una fibra óptica. Entre ellos se encuentra el llamado autocorrimiento espectral Raman (en inglés, *Soliton Self-Frequency Shift*, SSFS), observado por primera vez experimentalmente por Mitschke y Mollenauer [1986] y explicado teóricamente por Gordon [1986]. El fenómeno consiste en el traspaso de energía de las componentes azules hacia las rojas debido a la interacción con los núcleos del material de la fibra.

Si se trata de un solitón fundamental, el corrimiento espectral debido a este fenómeno puede ser calculado según [Agrawal, 2007; Cap. 12]

$$\Delta\nu_R = -\frac{4T_R |\beta_2| z}{15\pi T_0^4} = -\frac{4T_R(\gamma P_0)^2 z}{15\pi |\beta_2|} \quad (6.7)$$

donde T_R es el parámetro Raman, definido como el primer momento de la respuesta no lineal [Agrawal, 2007; Cap.2] y se utilizó $N = 1$ por tratarse de un soliton fundamental.

Esta dependencia de la longitud de onda del solitón con la potencia acoplada en la fibra ha sido utilizada a partir de 1999 para producir pulsos de femtosegundos sintonizables en distintos rangos espectrales; por ejemplo, 1566 – 1775 nm [Nishizawa y Goto, 1999], 850 – 1050 nm [Washburn *et al.*, 2001], 780 – 900 nm [Nishizawa *et al.*, 2002] y 1050 – 1690 nm [Takayanagi *et al.*, 2006]. En estos casos la potencia acoplada era controlada utilizando piezas mecánicas, hecho que limita la velocidad a la que se puede sintonizar. En el caso especial de la fuente presentada aquí, la sintonizabilidad de la fuente se logra al introducir un modulador acusto-óptico (AOM), que permite controlar rápida y precisamente la potencia acoplada en la PCF y, por lo tanto, la longitud de onda de los solitones de salida [Masip *et al.*, 2009]. Sin embargo, incluir el AOM genera una gran cantidad de dispersión positiva o *chirp* en los pulsos de entrada, hecho que puede modificar las propiedades de la fuente solitónica sintonizable. Se presenta un estudio experimental detallado junto con simulaciones numéricas que muestran la insensibilidad de la fuente solitónica ante el chirp de los pulsos de bombeo, en todo el rango de sintonizabilidad (860 – 1160 nm) [Caldarola *et al.*, 2012a].

6.2.1. Propagación de pulsos en fibras ópticas: Ecuación no lineal de Shöedinger (NLSE)

Los fenómenos físicos relevantes en la formación y propagación de pulsos ultracortos en fibras ópticas son satisfactoriamente explicados dentro de la teoría electromagnética clásica, es decir, utilizando las conocidas ecuaciones de Maxwell, que determinan la evolución de los campos electromagnéticos en medios materiales. A partir de estas ecuaciones, en ausencia

6.2. Desarrollo de una nueva fuente de luz rápidamente sintonizable para microscopías no lineales

de fuentes y para medios no magnéticos (tales como fibras ópticas de sílice, SiO_2), se puede llegar a la ecuación de ondas para el campo eléctrico \mathbf{E}

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} = -\frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} - \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{P}}{\partial t^2}, \quad (6.8)$$

donde \mathbf{P} es la llamada polarización inducida del medio, ϵ_0 es la permitividad del vacío y c es la velocidad de propagación de la luz en el vacío.

Para completar la descripción se necesita una relación entre la polarización inducida \mathbf{P} y el campo eléctrico \mathbf{E} , hecho que en general requiere de una descripción detallada del material en cuestión, utilizando la mecánica cuántica como teoría marco para poder incluir las resonancias del medio. La relación general entre estas dos magnitudes puede escribirse como se mostró en la ecuación 6.1. Es conveniente separar las contribuciones lineales a la polarización de las no lineales según

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{P}_L(\mathbf{r}, t) + \mathbf{P}_{NL}(\mathbf{r}, t). \quad (6.9)$$

La ecuación 6.8 puede expresada de una manera más compacta si se utiliza la relación

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} = \nabla(\nabla \cdot \mathbf{E}) - \nabla^2 \mathbf{E}, \quad (6.10)$$

se desprecia $\nabla(\nabla \cdot \mathbf{E})$ frente a $\nabla^2 \mathbf{E}$ y se combina con la ecuación 6.9:

$$\nabla^2 E - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = -\frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{P}_L}{\partial t^2} - \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{P}_{NL}}{\partial t^2}, \quad (6.11)$$

que es la ecuación a resolver.

Solo resta obtener la forma de la polarización lineal y no lineal para poder escribir la ecuación en términos de las propiedades de la fibra óptica en cuestión. Si se asume que la respuesta de la fibra es local y se trabaja a orden dipolar eléctrico en 6.1, la parte lineal de la polarización se relaciona con el campo eléctrico según la ecuación

$$\mathbf{P}_L(\mathbf{r}, t) = \int_{-\infty}^t \chi^{(1)}(t-t') \mathbf{E}(\mathbf{r}, t') dt', \quad (6.12)$$

mientras que la polarización no lineal se relaciona con el campo según

$$\mathbf{P}_{NL}(\mathbf{r}, t) = \int_{-\infty}^t \chi^{(3)}(t-t_1, t-t_2, t-t_3) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t_1) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t_2) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t_3) dt_1 dt_2 dt_3, \quad (6.13)$$

donde se utilizó el hecho que $\chi^{(2)} = 0$ pues SiO_2 es una molécula simétrica. Cabe destacar que esta última ecuación es la que introduce los efectos no lineales en la propagación de ondas en la fibra óptica. Por ejemplo, los efectos que generan el corrimiento espectral Raman se introducen con este término.

A partir de esta ecuación se puede obtener (ver [Agrawal, 2007; Cap. 2] para los detalles) la llamada ecuación no lineal de Shöedinger generalizada (*Generalized non linear*

Shöedinger Equation, GNLSE) en el dominio temporal:

$$\frac{\partial A}{\partial z} + \beta_1 \frac{\partial A}{\partial t} + i \beta_2 \frac{\partial^2 A}{\partial t^2} - \beta_3 \frac{\partial^3 A}{\partial t^3} + \dots = \\ i \gamma(\omega) \left(1 + \frac{i}{\omega_0} \frac{\partial}{\partial t} \right) \left(A(z, t) \int_{-\infty}^{\infty} R(t') |A(z, t-t')|^2 dt' \right), \quad (6.14)$$

donde $A(z, t)$ es la envolvente compleja del campo eléctrico³, β_n son los coeficientes de expansión de la constante de propagación alrededor de la frecuencia central de la portadora ω_0 y γ es el coeficiente no lineal de la fibra. El término $R(t')$ representa la contribución de la respuesta Raman de la fibra.

6.2.2. Simulaciones numéricas

Con el objeto de contrastar los resultados experimentales con la teoría, se realizaron simulaciones numéricas resolviendo la ecuación 6.14. Esto fue realizado en colaboración con el grupo del Prof. Diego F. Grosz en el Instituto Tecnológico Buenos Aires (ITBA⁴), que se dedica, entre otras líneas de investigación, a desarrollar métodos numéricos para estudiar la propagación de pulsos en fibras ópticas.

Las simulaciones incluyeron efectos dispersivos, Kerr, Raman instantáneo y retardado Dudley [2006], y utilizaron un algoritmo de paso adaptativo que conserva el número de fotones en cada paso (conocido como *Conservation Quantity Error*, CQE) [Heidt, 2009]. Los códigos de simulación son de libre acceso y se encuentran en www.freeopticsproject.org.

Para tener una buena coincidencia con los resultados experimentales, es necesario modelar certeramente la respuesta Raman de la fibra, $R(t')$ en la GNLSE, que en este caso fue modelada como

$$R(t) = (1 - f_R) \delta(t) + f_R h_R(t), \\ h_R(t) = (f_a + f_c) h_a(t) + f_b h_b(t), \\ h_a(t) = \tau_1 (\tau_1^{-2} + \tau_2^{-2}) e^{-t/\tau_2} \sin(t/\tau_1), \\ h_b(t) = [(2\tau_b - t)/\tau_b^2] e^{-t/\tau_b},$$

donde $f_R(t)$ representa la contribución fraccional del efecto Raman retardado h_R y se utilizó $\tau_1 = 12,2$ fs, $\tau_2 = 32$ fs, $\tau_b = 96$ fs, $f_a = 0,75$, $f_b = 0,21$, $f_c = 0,04$, and $f_R = 0,24$ [Lin y Agrawal, 2006]. Además, la dependencia del parámetro no lineal de la fibra γ con la frecuencia fue modelado como una función lineal, como se detalla en la tabla 6.2, junto con el resto de los parámetros relevantes de la PCF utilizada.

6.2.3. Dispositivo experimental para la fuente de luz sintonizable

El corazón de la fuente de luz sintonizable es una fibra óptica de cristal fotónico que no mantiene polarización, modelo NL-2.3-790-02 (Thorlabs), cuyo perfil de dispersión fue

³Se trabaja bajo la llamada aproximación de envolvente lenta, donde se asume que el campo eléctrico puede escribirse como $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = A(\mathbf{r}, t)e^{-i(\omega t - \phi)}$ con A una función con variación temporal lenta frente a $e^{-i(\omega t - \phi)}$.

⁴Actualmente en el Centro Atómico Bariloche.

6.2. Desarrollo de una nueva fuente de luz rápidamente sintonizable para microscopías no lineales

L	75 cm
λ_D	790 nm
β_2	-12,4 $\text{ps}^2 \text{km}^{-1}$
β_3	0,07 $\text{ps}^3 \text{km}^{-1}$
$\gamma(\omega)$	$\gamma_0(\omega_0) + (\omega - \omega_0)\gamma_1$
$\gamma_0(\omega_0)$	78 $\text{W}^{-1} \text{km}^{-1}$
γ_1	γ_0/ω_0
ω_0	2271 THz

Tabla 6.2: Parámetros utilizados para las simulaciones numéricas.

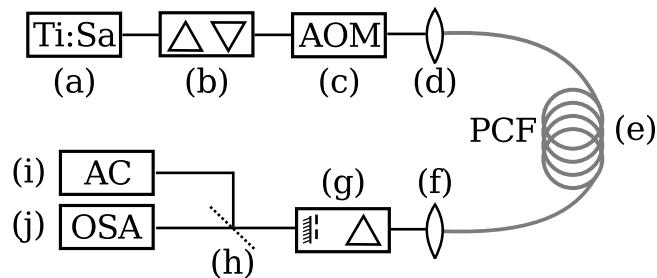


Figura 6.4: Esquema del dispositivo experimental para la fuente de luz solitónica. Se muestra esquemáticamente la distribución de los elementos ópticos: (a) Láser de femtosegundos (Ti:Za), (b) Compresor de prismas, (c) Modulador acusto óptico (AOM) (d) Lente de acomple a la PCF, (e) Fibra óptica de cristal fotónico (PCF), (f) Objetivo colimador, (g) Filtro espacial para seleccionar la porción del espectro a estudiar, (h) Espejo rebatible (i) Autocorrelador interferométrico *Fast-scan*, (j) Analizador de espectro (OSA). Extraído de [Caldarola *et al.*, 2012a].

mostrado en la sección 6.2 y cuyo cero de dispersión se encuentra en $\lambda_D = 790 \text{ nm}$. Como se mencionó anteriormente, para que la formación de solitones sea posible es necesario trabajar en el régimen de dispersión anómala, por lo tanto, los pulsos de bombeo fueron centrados en $\lambda_0 = 830 \text{ nm}$.

En la figura 6.4 se muestra esquemáticamente el dispositivo experimental de la fuente de luz sintonizable. Se utilizó como bombeo de la fibra un láser de pulsos ultracortos de Titanio Zafiro (Ti:Za), modelo MTS de KMLabs, cuya cavidad posee una frecuencia de repetición de 94 MHz, que entregaba pulsos de duración $\Delta t = 31 \text{ fs}$ (FWHM-sech²), limitados por transformada (TL), con un ancho spectral de $\sim 23 \text{ nm}$.

El *chirp* de los pulsos de bombeo es controlado por el compresor de prismas [Fork *et al.*, 1984], que fue construido para obtener pulsos limitados por transformada luego del modulador acusto óptico (prismas SF18 con una distancia de 78 cm entre ápices). Introduciendo mayor cantidad de vidrio en el camino óptico con el segundo prisma del compresor, se puede aumentar el *chirp* positivo hasta un valor de 1400 fs^2 . En caso de remover el compresor completamente, los pulsos limitados por transformada generados en el láser adquieren un valor de *chirp* de 7400 fs^2 al pasar por el AOM (se trata de $\sim 56 \text{ mm}$ de vidrio SF8). El AOM permite alta velocidad a la hora de cambiar la potencia acoplada en la fibra y además evita que reflexiones indeseadas vuelvan al laser, evitando el uso de diodos ópticos.

La lente utilizada para acoplar la fibra tiene una distancia focal $f = 2,75$ mm ($NA = 0,65$, Modelo C390TM-B, Thorlabs) mientras que para colimar nuevamente la luz a la salida de la fibra se utilizó un objetivo $40\times$ (Olympus MODELO, $NA = 0,65$) con el cual se logró colimar el haz y obtener un tamaño óptimo para el filtro espacial.

El filtro espacial consta de un prisma una lente y un filo metálico colocados de manera similar a la presentada anteriormente en Chilla y Martinez [1991], lo que permite seleccionar las longitudes de onda que se transmiten a la salida del filtro con la posición del filo, que también puede ser removido para estudiar el espectro completo a la salida de la fibra.

La salida del filtro espacial fue enviada o bien a un analizador de espectro (OSA AQ6315E, fabricado por ANDO) o bien a un autocorrelador interferométrico de segundo orden *home-made*, tipo *fast-scan* [Costantino *et al.*, 2001], para la caracterización temporal de los solitones.

6.2.4. Caracterización de la fuente de luz solitónica

La caracterización de la fuente de luz consiste en estudiar como es el espectro completo de salida y en particular las características espectrales y temporales de la rama solitónica infrarroja que resulta sintonizable por potencia en el rango $860 - 1160$ nm. Además se desea estudiar cómo afecta estas propiedades el *chirp* en los pulsos de bombeo.

Espectros de salida

En primer lugar se estudiaron las características espectrales de esta fuente de luz, para lo cual se evitó cualquier tipo de filtrado en el filtro espacial. Se midieron sucesivos espectros en el rango $500 - 1200$ nm para distintos valores de potencia acoplada. En la figura 6.5 se muestran los espectros medidos para dos potencias acopladas, (a) en el caso de bombeo limitado por transformada (TL) y (b) con *chirp* $C = 7400\text{ fs}^2$. Para mostrar los resultados de manera compacta se confeccionaron los mapas de colores (c) y (d), donde intensidades espectrales bajas se muestran en azul y las altas en rojo, en el caso de pulsos limitados por transformada (c) y el caso de pulsos con mucha dispersión (d).

En primer lugar, se puede notar el bombeo (centrado en 830 nm) presente en los espectros a la salida para todos los valores de potencia acoplados y cómo al aumentar la potencia acoplada a la fibra se va ensanchando el espectro. En segundo lugar, se puede ver que el espectro se ensancha ampliamente, tanto hacia el IR como hacia el visible. En el caso de bombeo limitado por transformada, se pueden distinguir 3 ramas solitónicas distintas, la primera aparece a los 8 mW , la segunda a los 25 mW y la última a los 45 mW , todas ellas de desplazan hacia el rojo al aumentar la potencia, debido al efecto SSFS. En el caso de los pulsos con alta dispersión también se puede identificar la primer rama solitónica, que se separa a los 10 mW pero las otras no se ven claramente debido a que el espectro es más difuso.

Si se compara el corrimiento espectral obtenido para un valor de potencia dado, por ejemplo 50 mW , en el caso TL se observa un corrimiento espectral de unos 250 nm mientras en el caso de pulsos con mucha dispersión el corrimiento es menor, solo de 200 nm. Para explicar esta diferencia se utilizaron simulaciones numéricas. Se colocaron como bombeo dos pulsos de idéntica potencia pico pero en un caso se utilizó un pulso limitado por

6.2. Desarrollo de una nueva fuente de luz rápidamente sintonizable para microscopías no lineales

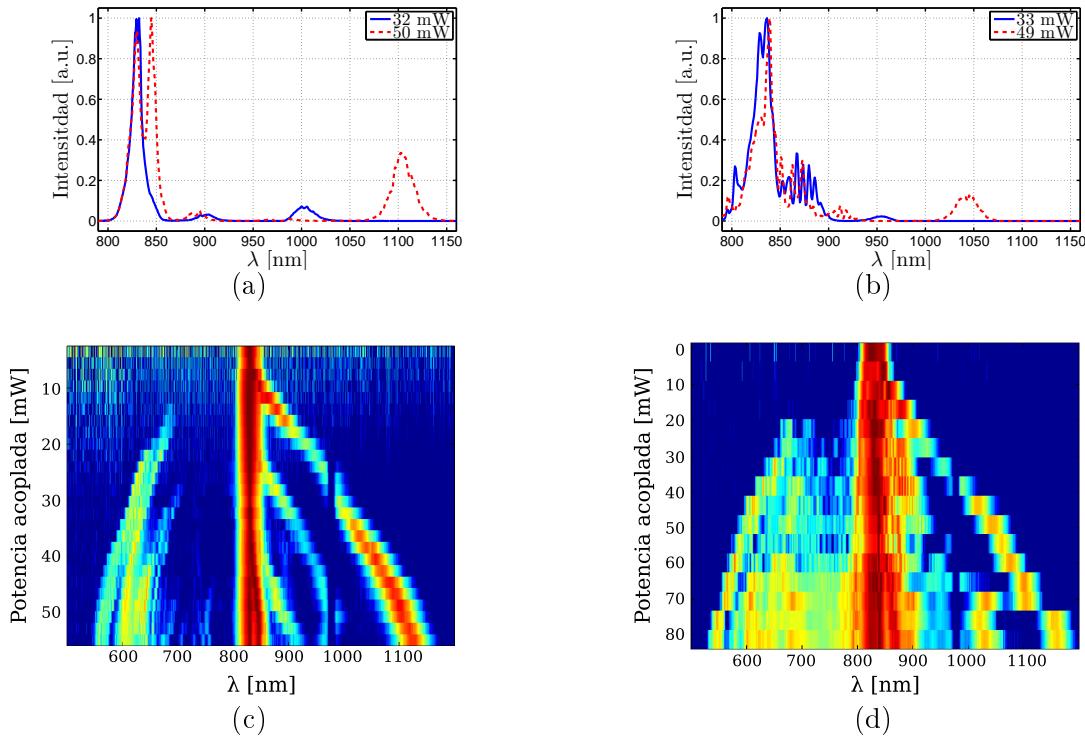


Figura 6.5: Espectros de salida de la PCF para distintas potencias acopladas. (arriba) Espectros de salida de la fibra para dos potencias acopladas, (a)para el caso de bombeo limitado por transformada y (b)con $C = 7400 \text{ fs}^2$. (abajo) Mapa de colores que condensa los resultados para todas las potencias acopladas. (c)Pulsos de bombeo limitados por transformada. (d)Pulsos de bombeo con *chirp* 7400 fs^2 .

transformada y en el otro un con $C = 7400 \text{ fs}^2$, y se observó la evolución del espectro mientras se propaga a lo largo de la fibra, obteniéndose las gráficas que muestra la figura 6.6.

En esta figura se puede observar que para el caso TL la rama solitónica se desprende en los primeros centímetros de fibra, mientras que en el otro caso el pulso tuvo que propagarse unos 20 cm para que se desprenda el solitón. Una vez formados los solitones, en ambos casos se observa un corrimiento espectral que aumenta con la distancia propagada. La diferencia reside en que en el segundo caso el solitón solamente tuvo 55 cm de fibra para propagarse mientras que en el primero utilizó prácticamente toda la PCF. Es por eso que el corrimiento observado para una misma potencia acoplada es mayor para el caso TL que para el caso con mucha dispersión en el pulso de entrada. Como conclusión de este pequeño análisis se puede decir que la reducción de corrimiento espectral que trae la utilización de pulsos no limitados por transformada puede ser compensada con mayor potencia o bien con una PCF más larga.

Estudio de la rama solitónica infrarroja

Una vez estudiado el comportamiento de todo el espectro, se utilizó el filtro espacial para seleccionar únicamente la primer rama solitónica infrarroja y así poder estudiar sus

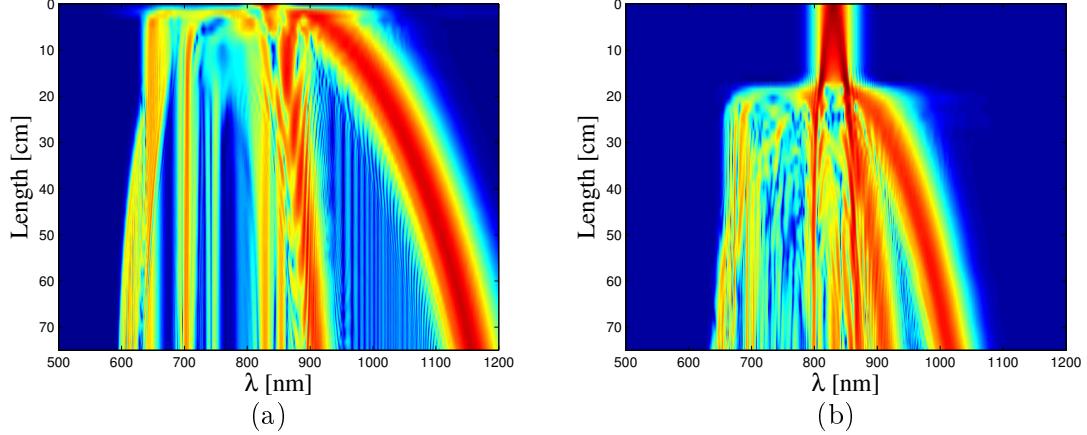


Figura 6.6: Evolución del espectro de los pulsos a lo largo de la fibra óptica. Resultados numéricos que muestran cómo cambia el espectro de los pulsos dentro de la fibra a lo largo de la propagación, para el caso de bombeo limitado por transformada (a) y para el caso de bombeo con $C = 7400 \text{ fs}^2$. Se puede observar en ambos casos como se desprende la rama solitónica infrarroja y luego sufre un corrimiento espectral hacia el rojo, por el efecto Raman.

propiedades temporales. Para ello se utilizó el autocorrelador mencionado en la sección 6.2.3.

En primer lugar se estudió el ancho temporal cuando los pulsos de bombeo están limitados por transformada. Se realizaron autocorrelaciones interferométricas de los solitones para distintas potencias acopladas en la fibra, es decir, para distintas longitudes de onda centrales λ_s . En la figura 6.7 se presentan los anchos altura mitad obtenidos, en función de la longitud de onda central, así como los anchos espectrales, extraídos de los espectros exhibidos anteriormente.

Notablemente, los anchos temporales y espectrales permanecen constantes a lo largo de todo el rango de sintonizabilidad, en concordancia con los resultados numéricos. Este hecho hace de esta fuente de luz una gran herramienta a la hora de utilizarla para microscopías

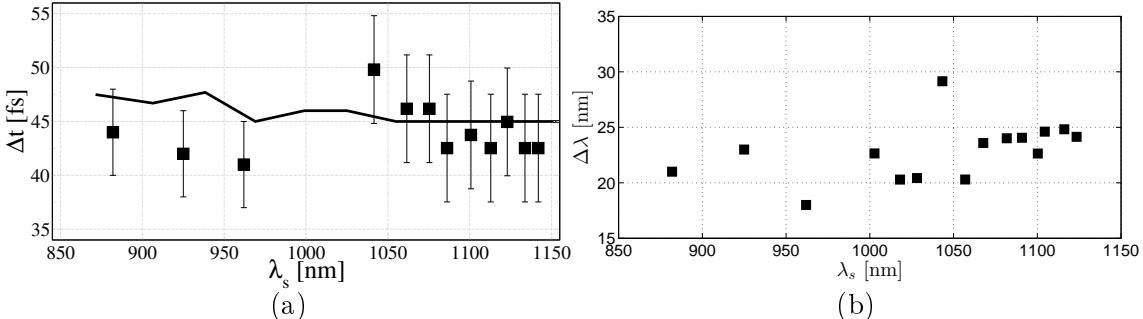


Figura 6.7: Comportamiento de la rama con pulsos de bombeo limitados por transformada. Resultados experimentales (puntos) y numéricos (línea llena) del ancho de pulso del solitón en función de la longitud de onda central (a) y ancho espectral (b), para pulsos de bombeo limitados por transformada. Los tres puntos de menor longitud de onda fueron medidos anteriormente por Masip *et al.* [2009].

6.2. Desarrollo de una nueva fuente de luz rápidamente sintonizable para microscopías no lineales

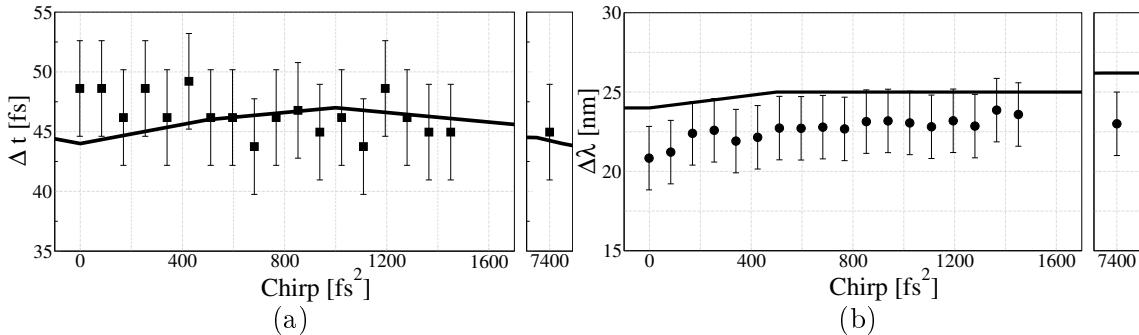


Figura 6.8: Comportamiento de la rama solitónica infrarroja frente al *chirp* del bombeo. (a) Ancho temporal de los solitones y (b) ancho espectral, para el solitón centrado en $\lambda_s = 1075$ nm. Los puntos son los resultados experimentales mientras que las líneas corresponden a los resultados numéricos, que coinciden. Notablemente, las propiedades espectrales y temporales se mantienen inalteradas frente al *chirp* de los pulsos de bombeo.

no lineales, pues permite, gracias al AOM, cambiar rápidamente (en el orden de los kHz) la longitud de onda de excitación sin cambiar el ancho temporal de los pulsos. Cabe mencionar que la potencia de salida también permanece constante en ~ 1 mW.

Además de la mencionada propiedad esta fuente resulta robusta ante el *chirp* de los pulsos de entrada, como sugieren los espectros mencionados con anterioridad. Es por eso que se llevó a cabo un estudio detallado de la dependencia del ancho temporal y espectral con este parámetro. Para ello se utilizó el compresor de prismas, que permitió variar el *chirp* entre 0 y 1400 fs^2 y luego se quitó completamente el compresor para estudiar el comportamiento con $C = 7400\text{ fs}^2$. Los resultados se muestran en la figura 6.8, que fueron tomados a una misma longitud de onda central para el solitón, $\lambda_s = 1075$ nm. Se puede ver que tanto el ancho espectral como el temporal se mantienen constantes para distintos valores de *chirp*, como predicen las simulaciones numéricas.

Estos resultados muestran que la fuente es altamente robusta frente al *chirp* presente en los pulsos de bombeo, lo que permite compactar la fuente quitando por completo el compresor de prismas, que a la vez simplifica el esquema experimental.

Una vez demostrado que las notables propiedades temporales y espirales de la fuente no dependen del *chirp* del bombeo de entrada, se corroboró que el comportamiento de sintonizabilidad también fuera el mismo para el caso $C = 7400\text{ fs}^2$. Los resultados se muestran en la figura 6.9. Se puede ver que a pesar de un bombeo con una enorme cantidad de *chirp*, el ancho temporal de los solitones se mantiene constante en 45 fs, manteniendo el producto $\Delta t \Delta \nu$ en el valor límite, es decir, los solitones siguen estando limitados por transformada y con forma de secante hiperbólica, para todo el rango espectral.

6.2.5. Aplicación de la fuente de luz

Una vez estudiadas las propiedades de esta fuente de luz, se propone aquí mostrar una posible utilidad para su aplicación en microscopía CARS y en TPEM.

Como se mencionó anteriormente la vibración correspondiente al estiramiento del enlace C-H, presente en diversas moléculas orgánicas, es usada comúnmente en microscopía

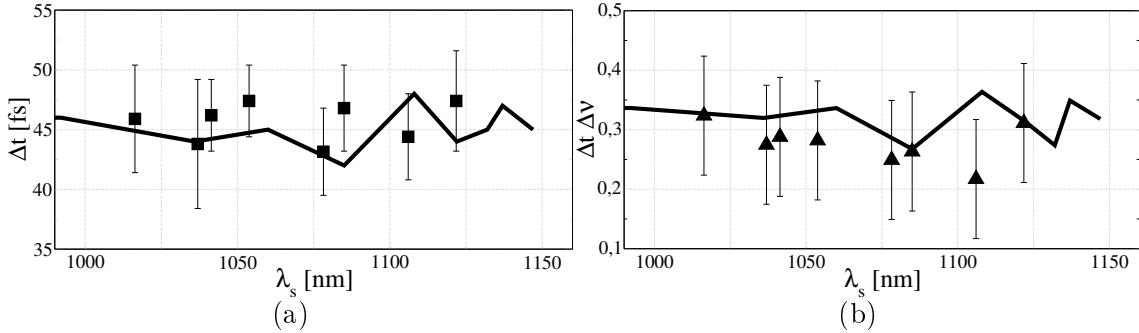


Figura 6.9: Ancho temporal de la rama solitónica con $C = 7400 \text{ fs}^2$. Medidas experimentales (puntos) del ancho de pulso del solitón en función de la longitud de onda central, para pulsos de bombeo no limitados por transformada. La línea completa representa los resultados numéricos, que muestran una buena coincidencia con los experimentales. El ancho temporal de los pulsos se mantiene constante, aún en este caso y los solitones continúan siendo limitados por transformada.

CARS por tener una alta sección eficaz; se encuentra en 2853 cm^{-1} . Este valor puede ser alcanzado con esta fuente de luz si se tiene en cuenta la diferencia de energía entre el bombeo ($\lambda = 830 \text{ nm}$) y la rama solitónica infrarroja estudiada: se obtiene este valor cuando $\lambda_s = 1088 \text{ nm}$. La mejora que puede introducir esta fuente es la posibilidad realizar una detección *lock-in*, modulando la potencia de entrada, que se traduce en modular la longitud de onda y así mejorar la relación señal ruido.

Por otro lado, la rápida sintonizabilidad de esta fuente puede ser útil para multiplexar la excitación de dos marcadores con espectros de absorción distintos para realizar TPEM a dos canales.

6.2.6. Conclusiones

Se presentó una fuente de luz solitónica rápidamente sintonizable, capaz de generar pulsos limitados por transformada de ancho $\sim 45 \text{ fs}$, en el rango $860 - 1160 \text{ nm}$. Se demostró teórica y experimentalmente que el ancho temporal y espectral se mantiene constante en todo el rango de sintonizabilidad, aún cuando los pulsos de bombeo tienen un alto valor de *chirp*, $C = 7400 \text{ fs}^2$. Este hecho evita la utilización de óptica de compensación (compresor), lo que simplifica la implementación de esta fuente. La única diferencia entre el caso TL y el caso con C grande se puede compensar con un aumento de la potencia acoplada o bien con una la utilización de una PCF más larga.

6.3. Microscopía de segunda armónica: estudio de estructuras híbridas

Se implementó la microscopía no lineal de generación de segunda armónica para el estudio de unas novedosas nanoestructuras híbridas plasmónicas-semiconductoras, que consisten en nanohilos de óxido de zinc (ZnO) acoplados con nanoantenas de oro, formadas por discos ubicados en forma de pentámeros. A través de un exhaustivo grupo de mediciones

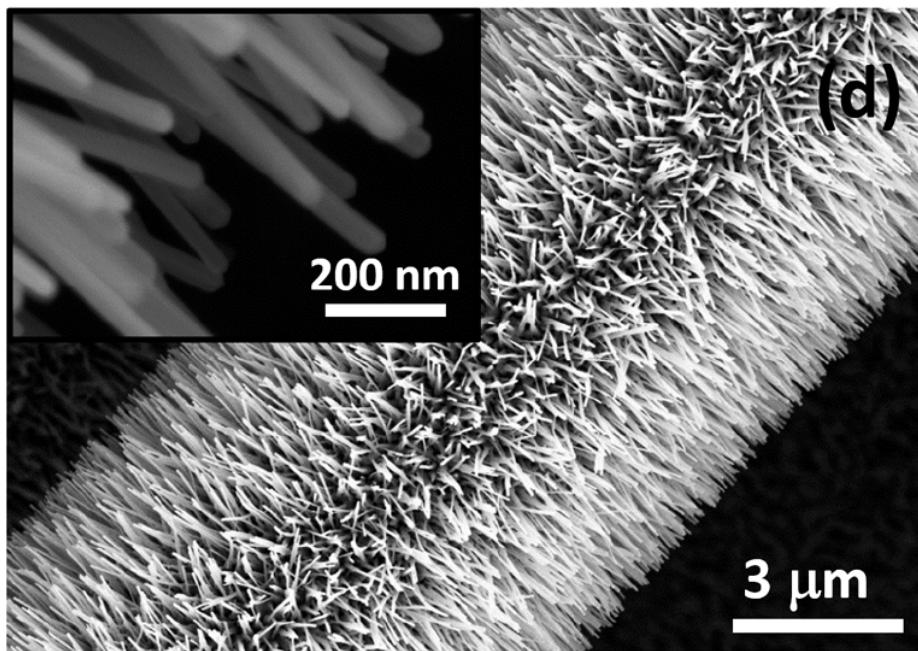


Figura 6.10: Imagen SEM de los nanohilos de ZnO. Se puede ver los nanohilos fabricados sobre la fibra de carbono. El recuadro pequeño muestra un acercamiento a los nanohilos.

se muestra que la eficiencia de conversión de segunda armónica resulta $\sim 3 \times 10^{-3} \%$, que está entre los valores más altos reportados para frecuencias ópticas [Grinblat *et al.*, 2014]. La intensidad de SH fue ~ 1700 veces mayor cuando los nanohilos se ubicaban en el *hot spot* de las nanoantenas plasmónicas.

Cabe mencionar que el trabajo presentado en esta sección fue fruto de la colaboración con el Laboratorio de Física del Sólido de la Universidad Nacional de Tucumán, liderado por el Porf. David Comedi y con el laboratorio del Prof. Stefan Maier, del Imperial College, Londres, Inglaterra.

6.3.1. Nanohilos de ZnO

Se trabajó con nanohilos (NW) de ZnO de $1 - 2 \mu\text{m}$ de largo y $\sim 30 \text{ nm}$ de diámetro con forma transversal hexagonal. Estos fueron fabricados con el método de transporte de vapor y deposición (VTD) [Grinblat *et al.*, 2012; Grinblat, 2015] sobre fibras de carbono comerciales, en el grupo del Prof. David Comedi, en la Universidad Nacional de Tucumán. En la figura 6.10 se muestra una imagen SEM de los nanohilos sobre la fibra de carbono, con un acercamiento en el cuadro pequeño. Los detalles de la fabricación pueden encontrarse en la Tesis Doctoral de Gustavo Grinblat [2015], con quien se realizaron las medidas experimentales que se presentan aquí.

Para el estudio de sus propiedades ópticas, los nanohilos fueron transferidos a un sustrato limpio de vidrio mediante el método de impresión seca, que consiste en presionar gentilmente las muestras contra el sustrato que recibe los nanohilos y quedan con el eje largo paralelo a la superficie del sustrato, orientados al azar. Una vez transferidos al sustrato

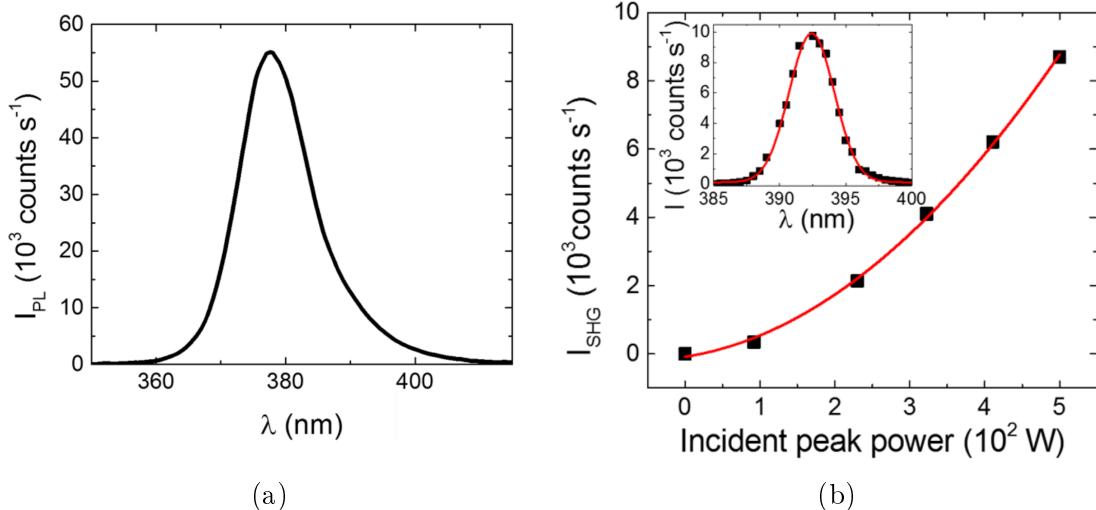


Figura 6.11: Propiedades ópticas de los nanohilos de ZnO. (a)Espectro de fotoluminiscencia. (b)Intensidad de segunda armónica en función de la potencia pico incidente. La línea roja corresponde a un ajuste cuadrático. En el cuadro pequeño se muestra el espectro de SHG, con el pico de emisión ~ 393 nm.

limpio se estudió la emisión de fotoluminiscencia y de segunda armónica de los nanohilos de ZnO.

En primer lugar se midió la fotoluminiscencia (PL) utilizando como fuente de luz un láser de 40 mWHe-Cd (Kimmon Koha Co.), $\lambda = 325$ nm y colectando la emisión en la configuración de *back scattering* con un espectrómetro de fibra óptica (AvaSpec-ULS3648). En la figura 6.11 (a) se que muestra la PL obtenida, cuyo pico de emisión se ubica en 380 nm, que corresponde a la banda excitónica del ZnO. En segundo lugar se estudió la intensidad de generación de segunda armónica, utilizando un láser de Ti:Za como fuente de pulsos ultracortos (~ 50 fs) en el rango 780 – 810 nm, con polarización circular, un espectrómetro Raman (U1000 Jobin-Yvon) con una cámara enfriada como detector (Horiba) para obtener el espectro de SHG. Además del espectro de SH se corroboró que la dependencia con la intensidad incidente era cuadrática, como se muestra en el ajuste de la figura 6.11 (b).

6.3.2. Nanoantenas intensificadoras

Las nanoantenas de oro consisten en discos de 100 nm de diámetro dispuestos en forma de pentámero, con 4 *gaps* de 20 nm de cada uno. Estas fueron diseñadas y fabricadas en el grupo del Prof. Stefan Maier en el Imperial College, Londres utilizando litografía de haz de electrones (para más detalles sobre la fabricación ver Grinblat *et al.* [2014]).

La figura 6.12 (a) muestra imágenes SEM del arreglo de pentámeros construido y el recuadro pequeño muestra una imagen de un único pentámero a mayor magnificación. Estas estructuras fueron diseñadas con la ayuda de simulaciones numéricas para tener una resonancia plasmónica ~ 780 nm, como se muestra en la figura 6.12 (b). Los espectros de extinción fueron obtenidos con la técnica *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR (Bruker Hyperion 2000) a incidencia normal con polarización lineal y las simulaciones numéricas fueron realizadas con el programa comercial *FDTD Solutions* (Lumerical Co.).

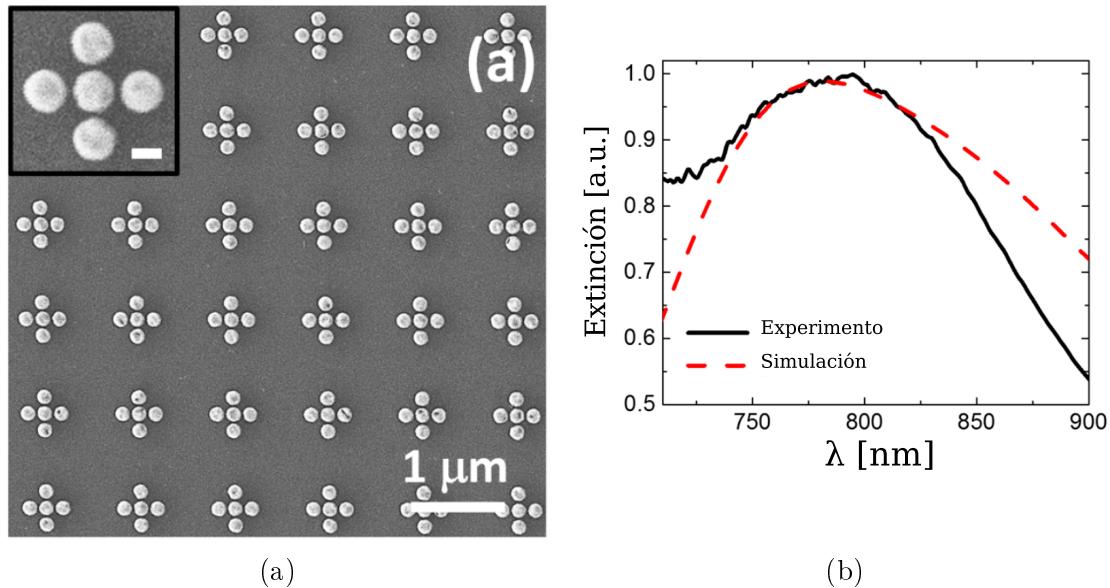


Figura 6.12: Nanoantenas intensificadoras con forma de pentámero. (a)Imagen SEM de la colección de nanoantenas con forma de pentámero. El recuadro muestra una estructura con mayor magnificación. (b)Espectro de extinción de las nanoantenas. La línea llena corresponde a las medidas experimentales y la línea roja punteada corresponde a las simulaciones numéricas.

Se observa que la resonancia plasmónica de estas nanoestructuras se encuentra alrededor de 780 nm.

6.3.3. Modificación del microscopio para detectar SH

Para poder estudiar la señal de segunda armónica de la muestra se modificó levemente la configuración del microscopio confocal *home-made* para transformarlo en un microscopio de segunda armónica. A diferencia de lo presentado hasta aquí, se trabajó con el láser de Ti:Za en configuración de pulsos, con un ancho de pulso de ~ 50 fs (frecuencia de repetición de $94MHz$) y en el rango espectral 780-810 nm. Se utilizó un objetivo 40X ($NA = 0,6$, Olympus) para enfocar el haz en la muestra a un tamaño de 700 nm (FWHM) y para colectar la señal de segunda armónica generada. La intensidad media (pico) utilizada sobre la muestra fue de 2×10^5 W/cm² (6×10^{10} W/cm²).

Para la colección de la señal de segunda armónica se utiliza el mismo objetivo y una fibra óptica multimodo como elemento confocal. Luego se colocó un filtro pasabanda entre 370-410 nm y un pasabajos con corte en 680 nm (ET680sp2p, Chroma), para evitar por completo la detección del láser de excitación. El APD que se usaba para detectar fue reemplazado por un fotomultiplicador enfriado en modo de conteo de fotones. Las imágenes de SH fueron tomadas con tiempos de integración de 1 a 10 ms/px, mientras que las medias realizadas en puntos fijos de la muestra el tiempo de integración de aumentó hasta 500 ms. Para los detalles del detector, referirse al apéndice A.

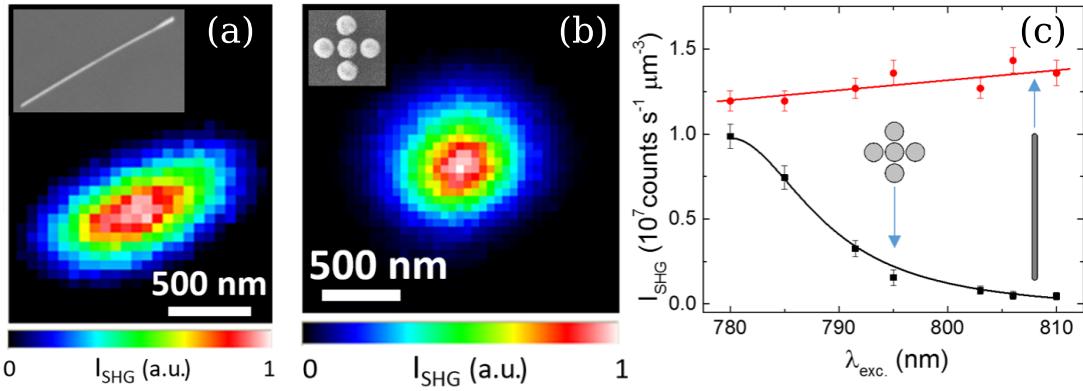


Figura 6.13: Segunda armónica generada por las nanoestructuras aisladas. (a) Imagen de segunda armónica de un nanohilo aislado, con una imagen SEM del nanohilo en el recuadro. (b) Imagen de segunda armónica de una nanoantena y su imagen SEM en el recuadro. (c) Intensidad de segunda armónica normalizada por el volumen de la estructura para distintas longitudes de onda de excitación. En círculos rojos se muestra la I_{SHG} para el nanohilo y en cuadrados negros la intensidad para la nanoantena, donde se realizó un ajuste lorenziano centrado en 780 nm.

6.3.4. Intensificación de segunda armónica

En primer lugar se deben estudiar la emisión de segunda armónica de las nanoantenas y de los nanohilos por separado, para luego poder estudiar su comportamiento en el caso híbrido.

La figura 6.13 (a) y (b) muestra imágenes de segunda armónica de los nanohilos y de los pentámeros, respectivamente, con un recuadro pequeño que muestra la imagen SEM de estas estructuras. En la figura 6.13 (c) se muestra la dependencia de la intensidad de segunda armónica de estas estructuras con la longitud de onda de excitación (valores normalizados con el volumen de la estructura), donde puede verse que los hilos tienen una respuesta aproximadamente constante mientras que los pentámeros muestran una marcada disminución de señal al alejarse de la resonancia plasmónica, cuyo pico está en ~ 780 nm.

Sistema híbrido: pentámeros de Au - nanohilos de ZnO

Una vez caracterizada la emisión de segunda armónica de los nanohilos y de las estructuras por separado se procedió a estudiar el sistema híbrido nanohilo-nanoantena. Para ello se transfirieron sobre los pentámeros los nanohilos (con el método de impresión seca) y mediante una inspección en el microscopio electrónico de la muestra se hallaron los lugares donde los nanohilos de ZnO quedaron ubicados en un *gap* de la nanoestructura metálica. Cabe notar que el hecho de tener 4 *gaps* incrementa sustancialmente la probabilidad de que un nanohilo caiga allí, si se lo compara con una estructura con un solo *gap*.

La figura 6.14 resume los resultados obtenidos para el sistema híbrido. (a) muestra una imagen SEM que evidencia la formación de la estructura híbrida nanohilo-nanoantena, pues se puede ver que el nanohilo se ubica en uno de los *gaps* del pentámero, lugar de mayor intensificación de campo. En (b) y (c) se muestra la imagen de segunda armónica obtenida

6.3. Microscopía de segunda armónica: estudio de estructuras híbridas

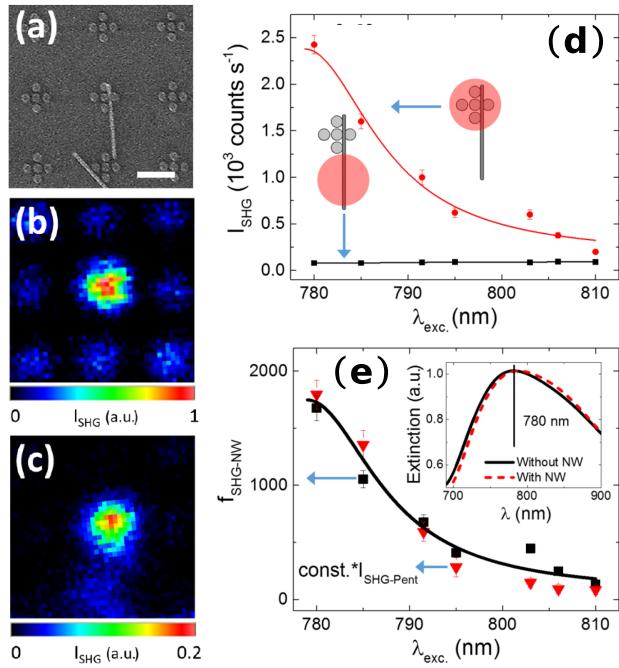


Figura 6.14: Intensificación de segunda armónica en nanoestructuras híbridas.
 (a) Imagen SEM de la zona estudiada. Se pueden ver los pentámeros y en el del centro un nanohilo ubicado en el *gap*, donde la intensificación es mayor. La barra corresponde a 500 nm. (b) y (c) Imágenes de segunda armónica de la misma zona mostrada en (a), con $\lambda_{\text{exc.}} = 780$ nm y 805 nm, respectivamente. En ambos se puede ver que la intensidad de SH es notablemente mayor en la antena central, debido a la presencia del nanohilo. (d) Dependencia de la SH con la longitud de onda de excitación, para el sistema híbrido (círculos rojos) y para el hilo no acoplado (cuadrados negros). Los esquemas representan las dos situaciones estudiadas. (d) Factor de intensificación de segunda armónica (cuadrados negros) junto con la intensidad de segunda armónica de la antena sola (triángulos rojos) multiplicada por una constante. Se puede observar que en la resonancia del sistema híbrido la intensificación alcanza un valor de ~ 1700 . En el recuadro se muestran los espectros de extinción calculados numéricamente para la antena sola y con el nanohilo encima.

con una excitación de $\lambda_{exc} = 780 \text{ nm}$ y 805 nm , respectivamente. En ambos casos se observa que el pentámero central tiene una intensidad de SH marcadamente mayor que en el resto de los pentámeros, debido a que no están acoplados con nanohilos. Cabe notar que el mencionado cambio en longitud de onda de excitación llevó a una disminución en un factor cinco de la intensidad de SH.

Luego se estudió la dependencia de la intensidad de SH del sistema híbrido con la longitud de onda de excitación y en la figura 6.14 (d) se la compara con la emisión del nanohilo solo. Se puede ver que la intensidad es unas 40 veces mayor en el caso híbrido. Sin embargo, los volúmenes excitados en ambos casos son muy distintos, debido a que la luz es confinada espacialmente en el *gap*.

También se calculó el factor de intensificación de SHG f_{SHG-NW} para el sistema híbrido, definido como la razón entre las dos curvas de la figura 6.14 (e), después de restar la contribución de los pentámeros aislados y normalizar cada curva por el área de excitación. La dependencia de este factor con la longitud de onda de excitación se muestra en la figura 6.14 (d), en rectángulos negros, donde puede verse que f_{SHG-NW} alcanza un valor máximo de 1700 en 780 nm. Este es uno de los valores más altos reportados en la literatura [Grinblat *et al.*, 2014]. Junto con esta curva se muestra la curva de intensidad de segunda armónica de los pentámeros solos multiplicada por una constante (triángulos rojos), que presenta una notable coincidencia con la curva del sistema híbrido. Esto puede interpretarse de la siguiente manera: el nanohilo funciona como una sonda de la intensidad de campo eléctrico en el *gap*, ya que la dependencia con la longitud de onda es la misma con o sin el nanohilo. El recuadro pequeño de la figura 6.14 (d) muestra los espectros de extinción simulados para la nanoantena sola y para el sistema híbrido, donde se ve que la resonancia plasmónica de las nanoantenas no es afectada por la presencia del nanohilo, lo que justifica que las curvas sean proporcionales.

6.3.5. Conclusiones

Se modificó exitosamente el microscopio confocal *home-made* para su utilización como microscopio de segunda armónica. Con él se estudió un sistema híbrido nanoantena metálica-nanohilo de ZnO que resulta ser un sistema altamente eficiente a la hora de generar segunda armónica. Se midió el factor de intensificación de segunda armónica, obteniéndose $f_{SHG_NW} \sim 1700$ y una eficiencia de conversión de $\sim 3 \times 10^{-5}$, que resultan estar entre los valores más altos reportados en la literatura para objetos en escalas nanométricas y en frecuencias ópticas.

Capítulo 7

Conclusiones y perspectivas

En esta Tesis se presentó una plataforma de microscopía multifunción que permitió abordar temas de la frontera del conocimiento en campos diversos como la biofísica y la nanofotónica. La plataforma combina un microscopio de fuerza atómica con un microscopio óptico multifunción, que permite el uso simultáneo del AFM con fluorescencia *wide field*. También posee un microscopio confocal de doble haz, que permite excitar la muestra con dos láseres simultáneamente y detectar en la configuración de *scattering*, de fluorescencia, Raman o segunda armónica. Adicionalmente se desarrolló una robusta fuente de luz solitónica sintonizable por potencia, basada en una PCF que puede ser utilizada como fuente de luz alternativa.

En el área de la biofísica, el equipo construido fue utilizado para estudiar la respuesta de células vivas (HC11) frente a un estímulo mecánico local, controlado y específico, realizado con puntas de AFM químicamente modificadas. Existen muy pocos trabajos en la literatura en los que se utiliza este tipo de microscopías combinadas para estudiar en tiempo real la respuesta de proteínas involucradas en el proceso de mecanotransducción. El uso de AFM en este tipo de experimentos resuelve las limitaciones de localización, control y reproducibilidad para ejercer un estímulo mecánico funcional, sumado a las capacidades de la microscopía de fluorescencia. La formación de adhesiones focales es un proceso de etapas múltiples dependiente de la fuerza aplicada, para el cual muchas preguntas aún están abiertas, y entre las cuales la dinámica de las proteínas involucradas es una fundamental. El abordaje de este trabajo permitió acceder al estudio de la dinámica de proteínas en adhesiones focales nacientes y maduras, en tiempo real, permitiendo la cuantificación del tiempo de reclutamiento de proteínas, que según nuestro conocimiento aún no había sido reportado en la literatura.

Específicamente, con este estudio se logró observar la formación de una adhesión focal naciente para el caso de las proteínas focales vinculina y FAK, cuando se aplican fuerzas del orden de los nN. En el caso de FAK se observó un tiempo de reclutamiento de (200 ± 80) s. También se observó una reorganización espacial de la proteína zixina dentro de adhesiones focales maduras y que esta reorganización depende de la fuerza aplicada.

En el área de la nanofotónica, se presentó una novedosa plataforma para sensado ultrasensible, basada en nanoantenas de silicio, capaces de intensificar 1000 veces el *scattering* Raman de moléculas de PMMA de un film polimérico depositado sobre las nanoantenas y 2000 veces la fluorescencia de moléculas de colorante embebidas en el film. Hemos demostrado experimentalmente además que esta nueva propuesta de nanoantena no-plasmónica

Capítulo 7. Conclusiones y perspectivas

tiene una bajísima conversión de energía lumínica a calórica, que se traduce en un incremento de temperatura menor si se lo compara con nanoantenas metálicas con resonancias similares. Sumado a esto, demostramos que estas nanoantenas no inducen el *quenching* de la emisión de moléculas fluorescentes, que siempre está presente en las nanoantenas plasmónicas debido a la cercanía del metal excitado en resonancia. Estos resultados abren nuevos horizontes en el diseño, fabricación y aplicación de estas antenas con ultra-bajo calentamiento en el rango visible-infrarrojo cercano y de posible uso simultáneo para la intensificación Raman y de fluorescencia. Adicionalmente en el área de la nanoplasmónica, se presentó brevemente en esta Tesis un esquema de biosensado molecular basado en el calentamiento plasmónico de nanopartículas metálicas, que permite la detección de concentraciones subnanomolares de un analito de interés.

Finalmente, la fuente de luz solitónica sintonizable por potencia (desarrollada y caracterizada) abre la posibilidad de mejorar el esquema de trabajo de las microscopías no lineales como CARS, agregando la posibilidad de selectivamente sintonizar la excitación anti-Stokes en el rango de los milisegundos para detectar sin marcado distintas especies químicas en la muestra. Adicionalmente se mostró la capacidad del microscopio de estudiar la generación de segunda armónica con alta resolución espacial, que se utilizó para estudiar la intensificación de este efecto en sistemas híbridos de nanohilos de ZnO y nanoantenas metálicas. Este esquema mostró proveer una notable intensificación para la segunda armónica de ~ 1700 , uno de los valores más altos reportados en la literatura para este fenómeno.

Apéndice A

Detectores

En este apéndice se exhiben detalles de los detectores utilizados: cámara CCD, fotodiodo de avalancha y PMTs.

A.1. Cámara CCD

Se trata de una cámara modelo Alta U2000, fabricada por Apogee Imaging Systems Inc. El CCD monocromático tiene 1600 x 1200 px y la posibilidad de agruparlos de a dos o de a cuatro (*binning*) para mejorar la relación señal ruido. Cada píxel tiene un tamaño físico de 7,4 μm x 7,4 μm , lo que brinda un área de imagen de 11,8x8,9 mm.

En el gráfico de la figura A.1 se muestra eficiencia cuántica de detección informada por el fabricante (curva negra), donde se observa el máximo alrededor de 500 nm. Una propiedad importante de esta cámara es que puede enfriarse hasta 50 grados por debajo de la temperatura ambiente, utilizando una celda Peltier incorporada, lo que lleva a una reducción del ruido de oscuridad y del ruido electrónico.

A.2. Fotodiodo de Avalanche (APD)

El fotodiodo de avalancha utilizado es el SPCM-AQR-12, de Perkin Elmer, que posee un área activa de 175 μm y una curva de eficiencia cuántica presente en la figura A.2. Este detector posee ruido de oscuridad de 500 cps y un tiempo muerto de unos 50 ns (es el tiempo que hay que esperar después de una cuenta para poder medir otra).

A.3. Fotomultiplicadores (PMT)

Para detectar *scattering* en el microscopio confocal y para medir fluorescencia en la aplicación de biosensado (capítulos 4 y 5) se utilizó un fotomultiplicador Hamamatsu, modelo R928. Este modelo consta de nueve etapas de amplificación (dínodos) y es conocido como PMT de cátodo extendido debido a que la curva de eficiencia cuántica se extiende

Apéndice A. Detectores

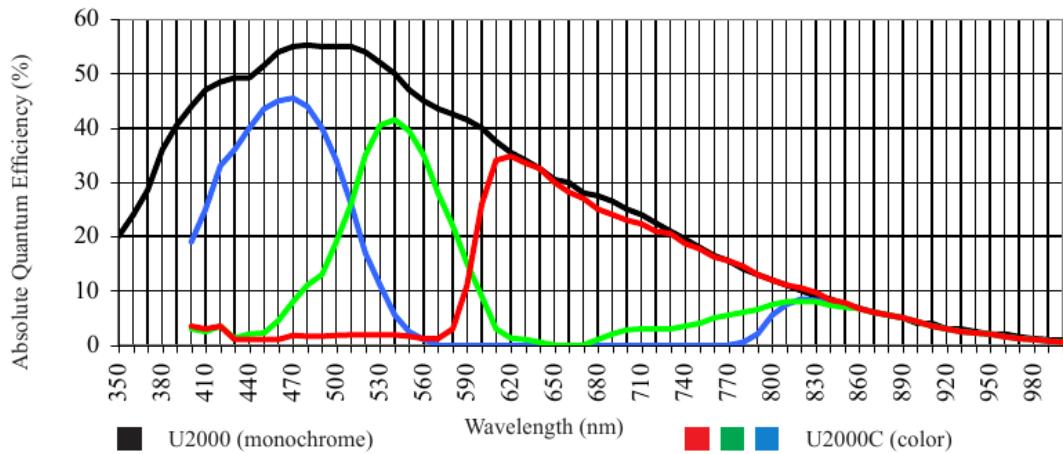


Figura A.1: Eficiencia cuántica de la cámara en función de la longitud de onda. La curva negra muestra la respuesta para la cámara utilizada, que tiene un máximo en 500 nm. Extraído de [Apogee Imaging Systems, 2010].

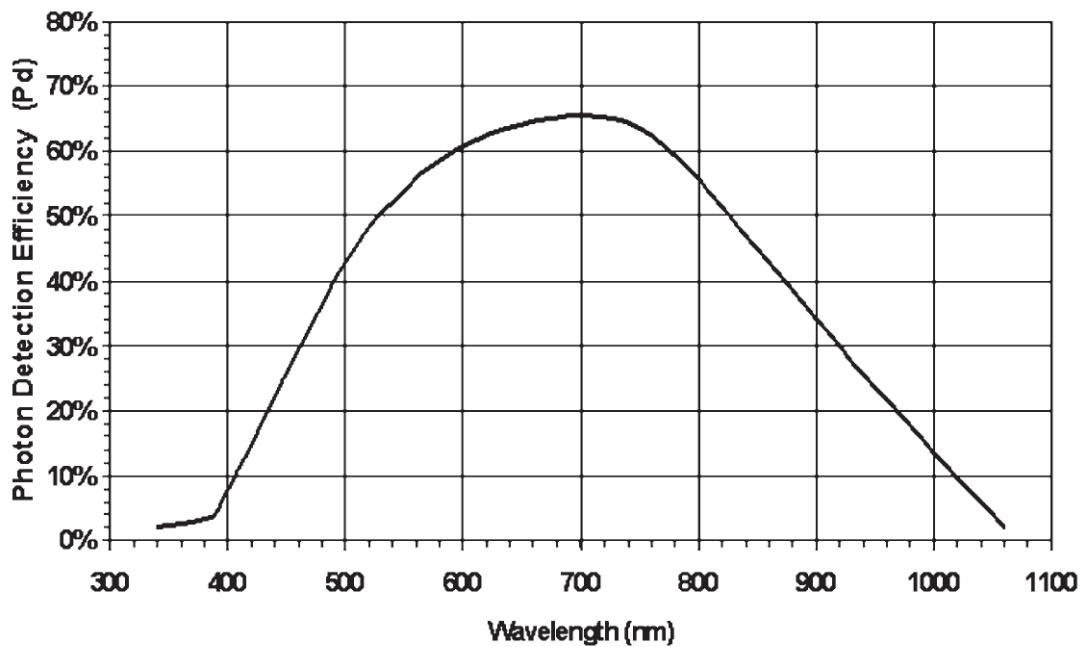


Figura A.2: Eficiencia cuántica para el APD en función de la longitud de onda. Se observa que el máximo alcanza el 65 % alrededor de 650 nm. Extraído de [Perkin Elmer, 2005].

A.3. Fotomultiplicadores (PMT)

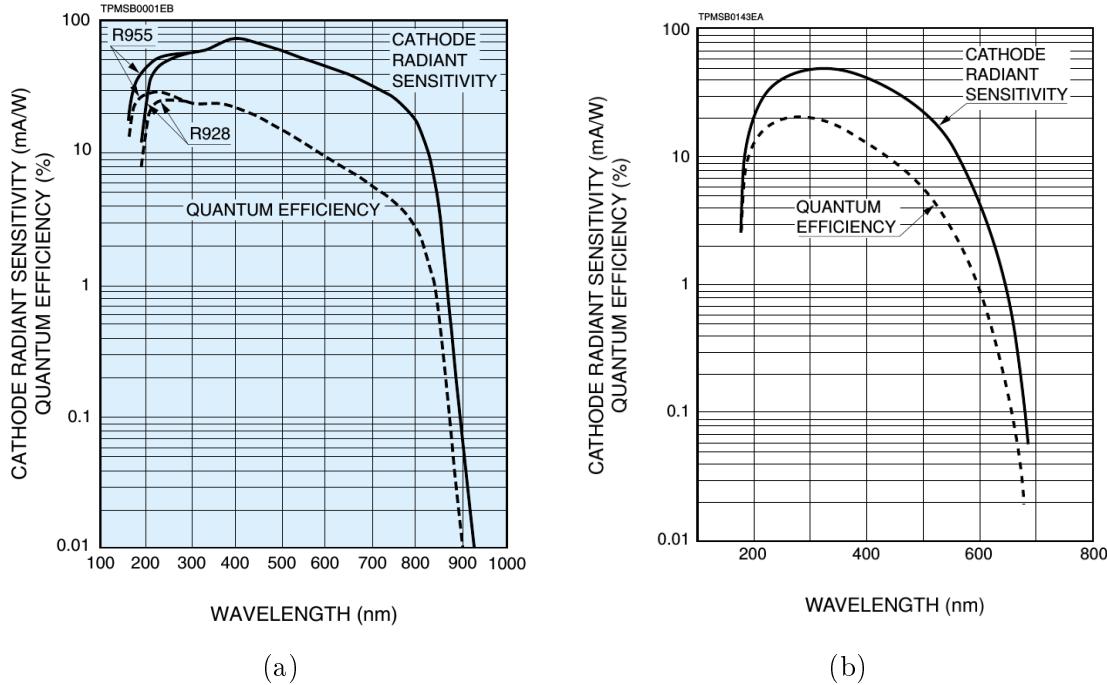


Figura A.3: Eficiencia cuántica para los PMTs en función de la longitud de onda. (a)Modelo R928. Se observa que el máximo alcanza $\sim 25\%$ alrededor de 250 nm, y cae al 1% alrededor de 850 nm. Extraído de [Hamamatsu Photonics, 1997]. (b)Modelo 1P28. En este caso el máximo alcanza el 20% alrededor de 300 nm, pero cae al 1% alrededor de 600 nm. Extraído de [Hamamatsu Photonics, 1999].

espectralmente hacia el rojo, permitiendo detectar con una eficiencia mayor al 10 % hasta 850 nm, como se muestra en la figura A.3 (a). La alimentación para este PMT puede variarse entre 0 y -1000 V, con lo que alcanza una ganancia máxima de $\sim 10^7$. El tiempo de respuesta de este detector es de 2 ns.

En el caso de la detección segunda armónica óptica (capítulo 6) se utilizó un PMT modelo 1P28 (respuesta espectral en la figura A.3 (b)) con un dispositivo termoeléctrico (C9144, Hamamatsu) que permite disminuir la temperatura hasta -25°C . Además se utilizó en el modo conteo, con un discriminador de pulsos modelo (F-100T, Advanced Research Instruments Corporation), que genera un pulso digital cada vez que detecta un fotón.

Apéndice A. Detectores

Apéndice B

Detalles elementos ópticos

En este apéndice se presentan los detalles espetrales de los elementos ópticos más relevantes para los microscopios presentados en esta tesis.

B.1. Microscopio combinado

En la figura B.1 se muestra el espectro de emisión del LED utilizado como fuente de luz para excitar fluorescencia en el modo *wide field* y los espectros de transmisión medidos para los filtros de excitación (ET470/40x, Chroma Technology Corp.), emisión (ET525/50m, Chroma Technology Corp.) y el espejo dicroico (T495lpxr, Chroma Technology Corp.).

B.2. Microscopio confocal

Para el microscopio confocal se utilizó un dicroico de fluorescencia (Di02-R532-25x36, Semrock) y otro para mezclar los haces (DM 750dcspxr, Chroma Technology corp.), sumado a un filtro pasabajos (SPF, ET680sp2p, Semrock) y un filtro notch (NF, NF03-532E-25, Semrock) para evitar detectar los láseres de excitación (uno verde y otro en el infrarrojo cercano). Los espectros de estos elementos se muestran en la figura B.2.

Apéndice B. Detalles elementos ópticos

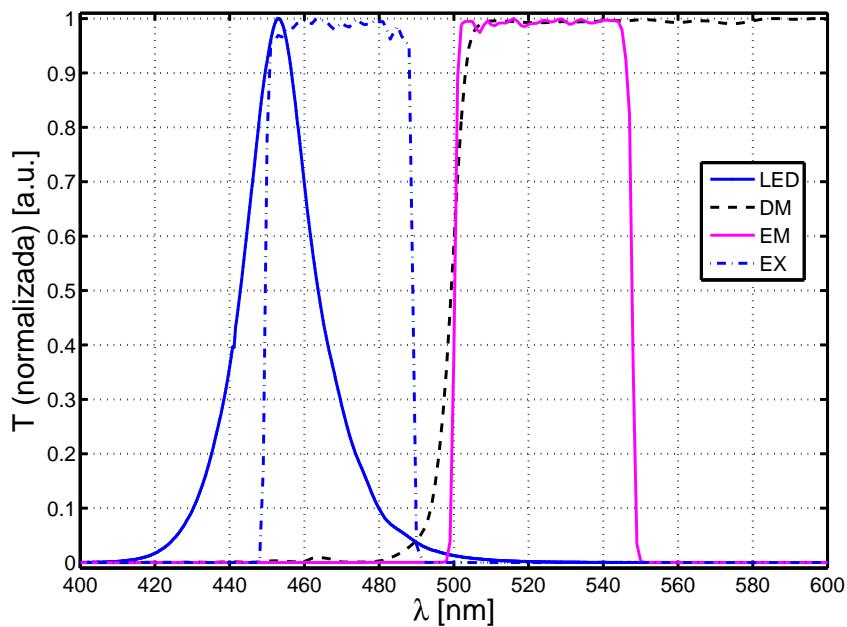


Figura B.1: Espectros de los elementos del microscopio *wide field*. Se muestra el espectro de emisión del LED y los de transmisión medidos para los filtros y el espejo dicroico.

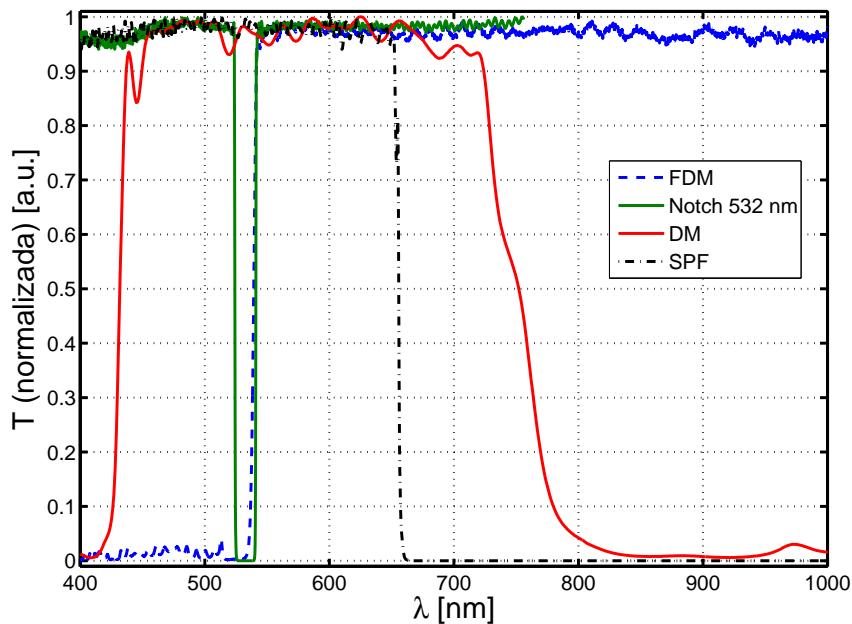


Figura B.2: Espectros de los elementos del microscopio confocal. Se muestran los espectros de transmisión (normalizados) para el dicroico de fluorescencia (FDM), el dicroico de mezclado con el Ti:Za (DM), el filtro notch para filtrar la excitación de fluorescencia (Notch 532) y el filtro pasabajos con corte en 680 nm (SPF).

Apéndice C

Medición de la PSF con distintas sondas

A la hora de medir la PSF se necesita asemejarse lo más posible a una fuente puntual ideal. Una manera de lograrlo consiste en utilizar moléculas individuales, que por su tamaño nanométrico pueden ser consideradas como fuentes puntuales para las dimensiones que se manejan en un microscopio óptico. Sin embargo, en muchos casos se desea medir repetidas veces la PSF y ahí las moléculas individuales no resultan convenientes porque se fotodegradan rápidamente.

Es por eso que se suelen utilizar nanopartículas metálicas o *beads* fluorescentes, que brindan buen contraste y brillo. En el caso de las *beads*, como típicamente poseen muchos fluoróforos el fotoblanqueo no es tan dramático y se pueden realizar varias PSFs hasta perder la señal por completo. El problema es que las *beads* suelen tener un tamaño mayor, entre 20 y 500 nm. Dado que estas dimensiones son comparables con los límites teóricos en la resolución de un microscopio óptico convencional [Abbe, 1873].

Al realizar una imagen con el microscopio (que se comporta como un sistema lineal) se obtiene como resultado una colección de valores de intensidad que pueden ser entendidos como el resultado de una convolución entre la función respuesta del sistema y el objeto. Esta manera de analizar los sistemas formadores de imágenes da lugar a una técnica conocida como deconvolución, que se utiliza para mejorar las imágenes, utilizando información de la PSF.

En la figura C.1 (a) se muestra el FWHM esperado para la PSF medida, para distintos valores de ancho de la sonda. Las distintas curvas corresponden a distintos valores del tamaño de la PSF. Las curvas obtenidas muestran una misma tendencia: para valores pequeños de la sonda (comparados con el tamaño de la PSF) el valor esperado coincide con el valor de la PSF, pues se acerca al caso ideal donde las dimensiones de la sonda son despreciables frente a la PSF. En el otro límite, cuando la sonda es mucho más grande que la PSF todas las curvas tienden a la recta unidad, pues ahora la PSF es despreciable frente a la sonda y el ancho medido será el de la sonda. En el recuadro pequeño se muestra un acercamiento de la zona de interés, donde se agregan dos líneas verticales en los valores de sonda utilizados.

En la figura C.1 (b) se grafican los mismos datos en una manera más práctica: se muestra la curva que relaciona el ancho simulado con la convolución en función del ancho

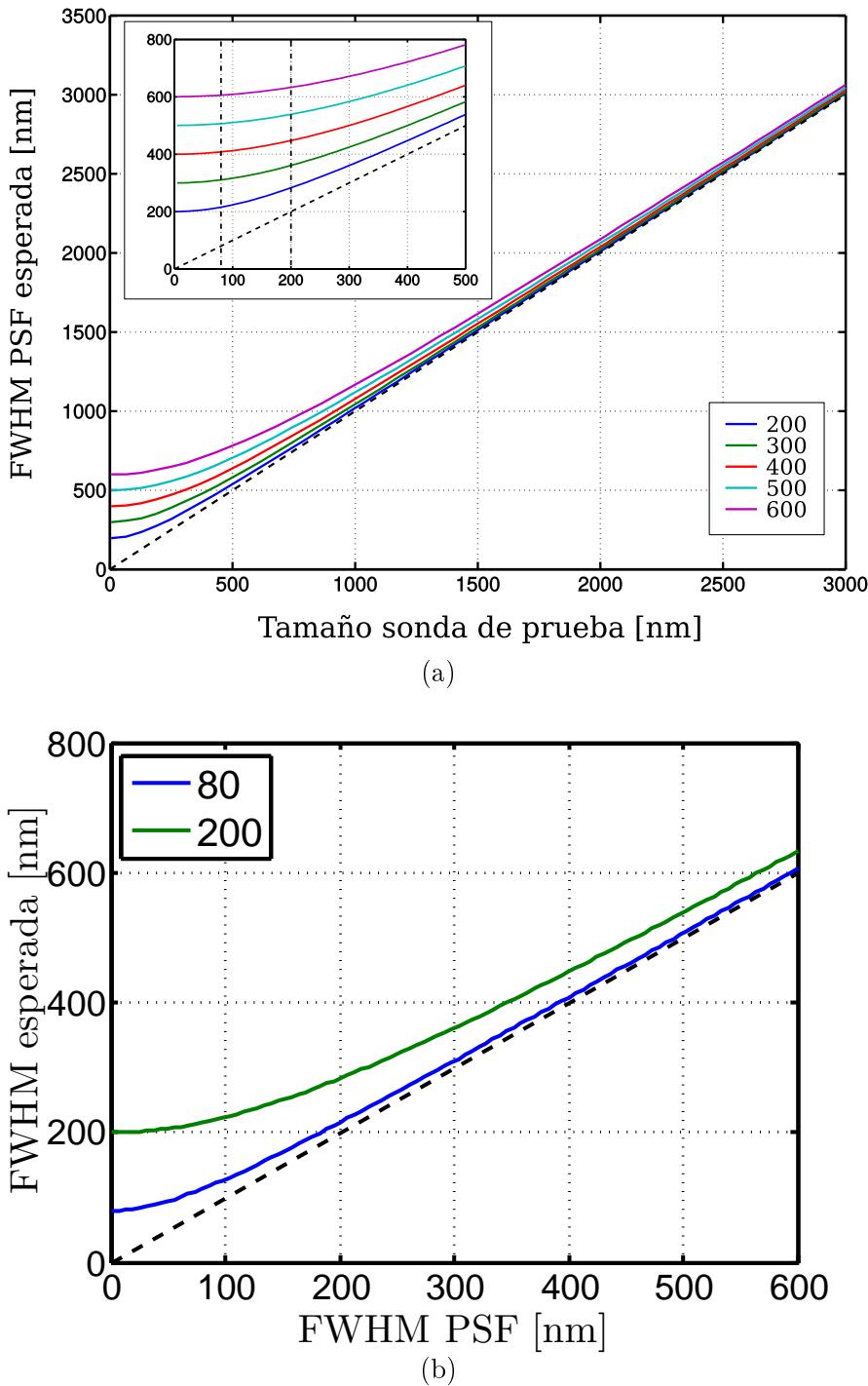


Figura C.1: Resultados de las simulaciones. (a) Ancho altura mitad esperado para la medición de la PSF en función del tamaño de la sonda utilizada. Las distintas curvas corresponden a los valores del ancho de la PSF indicados en la leyenda. (b) FWHM esperado para la PSF en función del tamaño real de la misma, para los dos tamaños de sonda utilizados en la presente Tesis: 80 nm y 200 nm.

de la PSF. Con esta curva se puede traducir un valor medido experimentalmente en un valor de PSF sin artefactos, como se mediría con una fuente puntual. En particular se muestran los dos tamaños de sonda utilizados, donde puede verse que la de 80 nm solo ensancha la PSF solo un 8% a partir de los 200 nm.

Bibliografia

Bibliografía

- Abbe E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–418, 1873.
- Abedin K. S. y F. Kubota. Wavelength tunable high-repetition-rate picosecond and femtosecond pulse sources based on highly nonlinear photonic crystal fiber. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 10(5):1203–1210, 2004.
- Agrawal G. P. *Non Linear Fiber Optics*. Academic Press, 2007.
- Albella P., M. A. Poyli, M. K. Schmidt, S. A. Maier, F. Moreno, J. J. Sáenz, y J. Aizpurua. Low-loss electric and magnetic field-enhanced spectroscopy with subwavelength silicon dimers. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(26):13573–13584, 2013.
- Albella P., R. Alcaraz de la Osa, F. Moreno, y S. A. Maier. Electric and magnetic field enhancement with ultralow heat radiation dielectric nanoantennas: considerations for surface-enhanced spectroscopies. *ACS Photonics*, 1(6):524–529, 2014.
- Alfonso-García A., R. Mittal, E. S. Lee, y E. O. Potma. Biological imaging with coherent raman scattering microscopy: a tutorial. *Journal of biomedical optics*, 19(7):071407–071407, 2014.
- Anger P., P. Bharadwaj, y L. Novotny. Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence. *Physical review letters*, 96(11):113002, 2006.
- Anker J. N., W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao, y R. P. Van Duyne. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature materials*, 7(6):442–453, 2008.
- Aouani H., M. Rahmani, M. Navarro-Cía, y S. A. Maier. Third-harmonic-upconversion enhancement from a single semiconductor nanoparticle coupled to a plasmonic antenna. *Nature nanotechnology*, 9(4):290–294, 2014.
- Apogee Imaging Systems . *Alta2000 Specifications*. Apogee Imaging Systems, Sunrise Ste 902, Roseville CA, USA, 1 edición, 2010. Hoja de datos.
- Araoz B. *Movimientos locales en películas delgadas de polímeros amorfos*. Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes 2160, C1428EGA, Buenos Aires, Argentina, 2012. An optional note.
- Ash E. A. y G. Nicholls. Super-resolution aperture scanning microscope. *Nature*, 237 (5357):510–512, 1972.
- Axelrod D., D. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, y W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical journal*, 16(9):1055, 1976.

Bibliografia

- Bachelot R., P. Gleyzes, y A. Boccara. Reflection-mode scanning near-field optical microscopy using an apertureless metallic tip. *Applied optics*, 36(10):2160–2170, 1997.
- Baffou G. y R. Quidant. Thermo-plasmonics: using metallic nanostructures as nano-sources of heat. *Laser & Photonics Reviews*, 7(2):171–187, 2013.
- Baffou G., C. Girard, y R. Quidant. Mapping Heat Origin in Plasmonic Structures. *Physical Review Letters*, 104(13):136805, 2010.
- Baffou G., P. Berto, E. Bermúdez Ureña, R. Quidant, S. Monneret, J. Polleux, y H. Rigneault. Photoinduced heating of nanoparticle arrays. *Acs Nano*, 7(8):6478–6488, 2013.
- Barja B. C., C. A. Chesta, T. D. Atvars, y P. F. Aramendía. Fluorescent polymer coatings with tuneable sensitive range for remote temperature sensing. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 116:13–16, 2013.
- Bastiaens P. I. y A. Squire. Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends in cell biology*, 9(2):48–52, 1999.
- Becker W., A. Bergmann, M. Hink, K. König, K. Benndorf, y C. Biskup. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microscopy research and technique*, 63(1):58–66, 2004.
- Bharadwaj P., B. Deutsch, y L. Novotny. Optical Antennas. *Advances in Optics and Photonics*, 1(3):438, 2009.
- Bhushan B. *Springer handbook of nanotechnology*. Springer Science & Business Media, 2010.
- Binnig G., H. Rohrer, C. Gerber, y E. Weibel. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Applied Physics Letters*, 40(2):178–180, 1982.
- Binnig G., C. F. Quate, y C. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56: 930–933, 1986.
- Bouhelier A., M. Beversluis, A. Hartschuh, y L. Novotny. Near-field second-harmonic generation induced by local field enhancement. *Physical review letters*, 90(1):013903, 2003.
- Boyd R. W. *Nonlinear optics*. Academic press, 2003.
- Boyer D., P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, y M. Orrit. Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers. *Science*, 297(5584):1160–1163, 2002.
- Bragas A. y O. Martínez. Field-enhanced scanning optical microscope. *Optics letters*, 25 (9):631–633, 2000.
- Bragas A., S. Landi, y O. Martínez. Laser field enhancement at the scanning tunneling microscope junction measured by optical rectification. *Applied physics letters*, 72(17): 2075–2077, 1998.
- Bruker . Probes and accessories. Catalog, 2011. www.brukerafmprobes.com.
- Cabanillas-Gonzalez J., G. Grancini, y G. Lanzani. Pump-probe spectroscopy in organic semiconductors: Monitoring fundamental processes of relevance in optoelectronics. *Advanced Materials*, 23(46):5468–5485, 2011.

- Caldarola M., V. A. Bettachini, A. A. Rieznik, P. G. Konig, M. E. Masip, D. F. Grosz, y A. V. Bragas. High-speed tunable photonic crystal fiber-based femtosecond soliton source without dispersion pre-compensation. *Papers in Physics*, 4:040001, 2012a.
- Caldarola M., C. von BIlderling, M. E. Masip, L. I. Pietrasanta, y A. V. Bragas. Combined optical-afm microscope for life sciences. En: *Frontiers in Optics*, páginas FTu1C–6. Optical Society of America, 2012b.
- Caldarola M., P. Albella, E. Cortés, M. Rahmani, T. Roschuk, G. Grinblat, R. F. Oulton, A. V. Bragas, y S. A. Maier. Non-plasmonic nanoantennas for surface enhanced spectroscopies with ultra-low heat conversion. Enviado a *Nature Nanotechnology*, 2015.
- Campagnola P. J. y L. M. Loew. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature biotechnology*, 21(11):1356–60, 2003.
- Campagnola P. J., A. Lewis, L. M. Loew, H. A. Clark, y W. A. Mohler. Second-harmonic imaging microscopy of living cells. *Journal of biomedical optics*, 6(3):277–286, 2001.
- Campagnola P. J., A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, y W. A. Mohler. Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophysical journal*, 82(1):493–508, 2002.
- Cao L., J.-S. Park, P. Fan, B. Clemens, y M. L. Brongersma. Resonant germanium nanoantenna photodetectors. *Nano letters*, 10(4):1229–1233, 2010.
- Cappella B. y G. Dietler. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface science reports*, 34(1):1–104, 1999.
- Chalfie M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, y D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148):802–805, 1994.
- Charras G. T. y M. A. Horton. Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation. *Biophysical Journal*, 82(6):2970–2981, 2002.
- Chen C. S. Mechanotransduction—a field pulling together? *Journal of cell science*, 121(20):3285–3292, 2008.
- Cheng J.-X. y X. S. Xie. Coherent anti-stokes raman scattering microscopy: instrumentation, theory, and applications. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(3):827–840, 2004.
- Chilla J. L. A. y O. E. Martinez. Direct determination of the amplitude and the phase of femtosecond light pulses,. *Opt Lett.*, 16:39–41, 1991.
- Coons A. H., H. J. Creech, y R. N. Jones. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Experimental Biology and Medicine*, 47(2):200–202, 1941.
- Coronado E. A., E. R. Encina, y F. D. Stefani. Optical properties of metallic nanoparticles: manipulating light, heat and forces at the nanoscale. *Nanoscale*, 3(10):4042–4059, 2011.
- Costantino S., A. R. Libertun, P. D. Campo, J. R. Torga, y O. E. Martínez. Fast scanner with position monitor for large optical delays. *Optics Communications*, 198(4-6):287 – 291, 2001.

Bibliografia

- Cubukcu E., E. A. Kort, K. B. Crozier, y F. Capasso. Plasmonic laser antenna. *Applied Physics Letters*, 89(9):093120, 2006.
- Curley P., A. Ferguson, J. White, y W. Amos. Application of a femtosecond self-sustaining mode-locked ti: sapphire laser to the field of laser scanning confocal microscopy. *Optical and quantum electronics*, 24(8):851–859, 1992.
- Custance O., R. Perez, y S. Morita. Atomic force microscopy as a tool for atom manipulation. *Nature nanotechnology*, 4(12):803–810, 2009.
- Davidovits P. y M. D. Egger. Scanning laser microscope. *Nature*, 223:831, 1969.
- Davidovits P. y M. D. Egger. Photomicrography of corneal endothelial cells in vivo. *Nature*, 244:366–367, 1973.
- Denk W., J. H. Strickler, W. W. Webb, *et al.* Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73–76, 1990.
- Deprédurand V., P. Miron, A. Labergue, M. Wolff, G. Castanet, y F. Lemoine. A temperature-sensitive tracer suitable for two-colour laser-induced fluorescence thermometry applied to evaporating fuel droplets. *Measurement Science and Technology*, 19(10):105403, 2008.
- Dodson S., M. Haggui, R. Bachelot, J. Plain, S. Li, y Q. Xiong. Optimizing electromagnetic hotspots in plasmonic bowtie nanoantennae. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4(3):496–501, 2013.
- Dudley J. M. Supercontinuum generation in photonic crystal fiber. 78(December):1135–1184, 2006.
- Duncan M. D., J. Reintjes, y T. J. Manuccia. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope. *Optics Letters*, 7(8):350, 1982.
- Ellinger P. y A. Hirt. Mikroskopische beobachtungen an lebenden organen mit demonstrationen (intravitalmikroskopie). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 147(1):63–63, 1929.
- Engel A. y D. J. Müller. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(9):715–718, 2000.
- Estrada L. C., P. F. Aramendía, y O. E. Martínez. 10000 times volume reduction for fluorescence correlation spectroscopy using nano-antennas. *Opt. Express*, 16(25):20597–20602, 2008.
- Fischer U. C. Resolution and contrast generation in scanning near field optical microscopy. En: *Scanning Tunneling Microscopy and Related Methods*, páginas 475–496. Springer, 1990.
- Fischer U. C. y D. Pohl. Observation of single-particle plasmons by near-field optical microscopy. *Physical review letters*, 62(4):458, 1989.
- Florin E.-L., V. T. Moy, y H. E. Gaub. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264(5157):415–417, 1994.

- Fork R. L., O. E. Martínez, y J. P. Gordon. Negative dispersion using pairs of prisms. *Opt. Lett.*, 9(5):150–152, 1984.
- Fort E. y S. Grésillon. Surface enhanced fluorescence. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41(1):013001, 2008.
- Fu L. y M. Gu. Fibre-optic nonlinear optical microscopy and endoscopy. *Journal of microscopy*, 226(Pt 3):195–206, 2007.
- Galbraith C. G., K. M. Yamada, y M. P. Sheetz. The relationship between force and focal complex development. *The Journal of cell biology*, 159(4):695–705, 2002.
- Gavara N. y R. S. Chadwick. Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips. *Nature nanotechnology*, 7(11):733–736, 2012.
- Geiger B., A. Bershadsky, R. Pankov, y K. M. Yamada. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(1):793–805, 2001.
- Gobin A. M., M. H. Lee, N. J. Halas, W. D. James, R. A. Drezek, y J. L. West. Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy. *Nano letters*, 7(7):1929–1934, 2007.
- Goldman R. D., J. R. Swedlow, y D. L. Spector. *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor Press, 2010.
- Gordon J. P. Theory of the soliton self-frequency shift. *Optics letters*, 11(10):662–664, 1986.
- Graf R. F. *Modern dictionary of electronics*. Newnes, 1999.
- Grange R., G. Brönstrup, M. Kiometzis, A. Sergeyev, J. Richter, C. Leiterer, W. Fritzsche, C. Gutsche, A. Lysov, W. Prost, et al. Far-field imaging for direct visualization of light interferences in gaas nanowires. *Nano letters*, 12(10):5412–5417, 2012.
- Grinblat G. *Propiedades ópticas lineales y no lineales de nanoestructuras semiconductoras*. Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes 2160, C1428EGA, Buenos Aires, Argentina, 2015. Aún no presentada.
- Grinblat G., M. Capeluto, M. Tirado, A. Bragas, y D. Comedi. Hierarchical zno nanostructures: Growth mechanisms and surface correlated photoluminescence. *Applied Physics Letters*, 100(23):233116, 2012.
- Grinblat G., M. Rahmani, E. Cortés, M. Calderola, D. Comedi, S. A. Maier, y A. V. Bragas. High-efficiency second harmonic generation from a single hybrid zno nanowire/au plasmonic nano-oligomer. *Nano letters*, 14(11):6660–6665, 2014.
- Grumstrup E. M., M. M. Gabriel, E. M. Cating, C. W. Pinion, J. D. Christesen, J. R. Kirschbrown, E. L. Vallorz III, J. F. Cahoon, y J. M. Papanikolas. Ultrafast carrier dynamics in individual silicon nanowires: Characterization of diameter-dependent carrier lifetime and surface recombination with pump–probe microscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(16):8634–8640, 2014.

Bibliografia

- Göppert-Mayer M. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen. *Annalen der Physik*, 401(3):273–294, 1931.
- Hagan T., D. Pilloud, y P. Suppan. Thermochromic shifts of some molecular and exciplex fluorescence spectra. *Chemical physics letters*, 139(6):499–502, 1987.
- Hamamatsu Photonics . *Photomultiplier Tubes R928, R955*. Hamamatsu Photonics, 314-5, Shimokanzo, Toyooka-village, Iwata-gun, Shizuoka-ken, 438-0193, Japan, 1 edición, 1997. Hoja de datos.
- Hamamatsu Photonics . *Photomultiplier Tubes 1P28*. Hamamatsu Photonics, 314-5, Shimokanzo, Toyooka-village, Iwata-gun, Shizuoka-ken, 438-0193, Japan, 1 edición, 1999. Hoja de datos.
- Han G., P. Ghosh, M. De, y V. M. Rotello. Drug and gene delivery using gold nanoparticles. *Nanobiotechnology*, 3(1):40–45, 2007.
- Harootunian a., E. Betzig, M. Isaacson, y A. Lewis. Super-resolution fluorescence near-field scanning optical microscopy. *Applied Physics Letters*, 49(11):674, 1986.
- Hasegawa A. y F. Tappert. Transmission of stationary nonlinear optical pulses in dispersive dielectric fibers. I. anomalous dispersion. *Applied Physics Letters*, 23(3):142–144, 1973.
- Heeg S., A. Oikonomou, R. Fernandez-Garcia, C. Lehmann, S. A. Maier, A. Vijayaraghavan, y S. Reich. Plasmon-enhanced raman scattering by carbon nanotubes optically coupled with near-field cavities. *Nano letters*, 14(4):1762–1768, 2014.
- Heidt A. Efficient adaptive step size method for the simulation of supercontinuum generation in optical fibers,. *J Lightwave Technol.*, 27:3984–3991, 2009.
- Heimstädt O. Das fluoreszenzmikroskop. *Z Wiss Mikrosk*, 28:330–337, 1911.
- Helenius J., C.-P. Heisenberg, H. E. Gaub, y D. J. Muller. Single-cell force spectroscopy. *Journal of Cell Science*, 121(11):1785–1791, 2008.
- Hellwarth R. y P. Christensen. Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline znse. *Optics Communications*, 12(3):318–322, 1974.
- Hinterdorfer P. y Y. F. Dufrêne. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nature Methods*, 3(5), 2006.
- Hirsch L., R. Stafford, J. Bankson, S. Sershen, B. Rivera, R. Price, J. Hazle, N. Halas, y J. West. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23):13549–13554, 2003.
- Hooke R. *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses: With Observations and Inquiries Thereupon*. John Martyn, printer to the Royal Society, 1664.
- Hou Y., A. M. Bardo, C. Martinez, y D. A. Higgins. Characterization of molecular scale environments in polymer films by single molecule spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(2):212–219, 2000.

- Huang L. y J.-X. Cheng. Nonlinear optical microscopy of single nanostructures. *Annual Review of Materials Research*, 43:213–236, 2013.
- Hutter J. y J. Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments*, 64:6–11, 1993.
- Höppener C. y L. Novotny. Antenna-based optical imaging of single Ca^{2+} transmembrane proteins in liquids. *Nano Letters*, 8(2):642–646, 2008. PMID: 18229969.
- Inouye Y. y S. Kawata. Near-field scanning optical microscope with a metallic probe tip. *Optics letters*, 19(3):159–161, 1994.
- Ippen E., C. Shank, y T. Gustafson. Self-phase modulation of picosecond pulses in optical fibers. *Applied Physics Letters*, 24(4):190–192, 1974.
- Isobe K., W. Watanabe, S. Matsunaga, T. Higashi, K. Fukui, y K. Itoh. Multi-spectral two-photon excited fluorescence microscopy using supercontinuum light source. *Japanese journal of applied physics*, 44(1L):L167, 2005.
- Iwai K., Y. Matsumura, S. Uchiyama, y A. P. de Silva. Development of fluorescent microgel thermometers based on thermo-responsive polymers and their modulation of sensitivity range. *Journal of Materials Chemistry*, 15(27-28):2796–2800, 2005.
- Jäckel F., A. Kinkhabwala, y W. Moerner. Gold bowtie nanoantennas for surface-enhanced raman scattering under controlled electrochemical potential. *Chemical Physics Letters*, 446(4):339–343, 2007.
- Jares-Erijman E. A. y T. M. Jovin. Fret imaging. *Nature biotechnology*, 21(11):1387–1395, 2003.
- Jares-Erijman E. A. y T. M. Jovin. Imaging molecular interactions in living cells by fret microscopy. *Current opinion in chemical biology*, 10(5):409–416, 2006.
- Johnson T. W., Z. J. Lapin, R. Beams, N. C. Lindquist, S. G. Rodrigo, L. Novotny, y S.-H. Oh. Highly reproducible near-field optical imaging with sub-20-nm resolution based on template-stripped gold pyramids. *ACS nano*, 6(10):9168–74, 2012.
- Kano H. y H.-o. Hamaguchi. Ultrabroadband ($>2500 \text{ cm}^{-1}$) multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a supercontinuum generated from a photonic crystal fiber. *Applied Physics Letters*, 86(12):121113, 2005.
- Kano H. y H.-O. Hamaguchi. In-vivo multi-nonlinear optical imaging of a living cell using a supercontinuum light source generated from a photonic crystal fiber. *Optics express*, 14(7):2798–804, 2006.
- Khurjin J. B. y A. Boltasseva. Reflecting upon the losses in plasmonics and metamaterials. *MRS bulletin*, 37(08):768–779, 2012.
- Knight J., T. Birks, P. S. J. Russell, y D. Atkin. All-silica single-mode optical fiber with photonic crystal cladding. *Optics letters*, 21(19):1547–1549, 1996.
- Knoll M. y E. Ruska. Das elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik*, 78(5-6):318–339, 1932.

Bibliografia

- Kuhlicke A., S. Schietinger, C. Matyssek, K. Busch, y O. Benson. In situ observation of plasmon tuning in a single gold nanoparticle during controlled melting. *Nano letters*, 13 (5):2041–2046, 2013.
- Kulzer F. y M. Orrit. Single-molecule optics. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 55:585–611, 2004.
- Lakowicz J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2007.
- Lakowicz J. R., H. Szmacinski, K. Nowaczyk, K. W. Berndt, y M. Johnson. Fluorescence lifetime imaging. *Analytical biochemistry*, 202(2):316–330, 1992.
- Lal S., S. E. Clare, y N. J. Halas. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact. *Accounts of chemical research*, 41(12):1842–1851, 2008a.
- Lal S., N. K. Grady, J. Kundu, C. S. Levin, J. B. Lassiter, y N. J. Halas. Tailoring plasmonic substrates for surface enhanced spectroscopies. *Chemical Society Reviews*, 37 (5):898–911, 2008b.
- Lawson C. y D. Schlaepfer. Integrin adhesions: Who's on first? what's on second? *Cell adhesion & migration*, 6(4):302–306, 2012.
- Le Ru E. y P. Etchegoin. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*. Elsevier, 2008.
- Le Ru E. C. y P. G. Etchegoin. Single-molecule surface-enhanced raman spectroscopy. *Annual review of physical chemistry*, 63:65–87, 2012.
- Lee G. U., D. A. Kidwell, y R. J. Colton. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. *Langmuir*, 10(2):354–357, 1994.
- Lee J. H., J. van Howe, C. Xu, y X. Liu. Soliton self-frequency shift: experimental demonstrations and applications. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 14 (3):713–723, 2008.
- Levy R. y M. Maaloum. Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology*, 13(1):33, 2002.
- Lichtman J. W. y J.-A. Conchello. Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2(12):910–919, 2005.
- Life Technologiess . Spectra Viewer.
- Ligler F. S. y C. R. Taitt. *Optical biosensors: today and tomorrow*. Elsevier, 2011.
- Lim S.-M., J. P. Trzeciakowski, H. Sreenivasappa, L. J. Dangott, y A. Trache. Rho-induced cytoskeletal tension controls adaptive cellular remodeling to mechanical signaling. *Integrative biology*, 4(6):615–627, 2012.
- Lin Q. y G. Agrawal. Raman response function for silica fibers,. *Opt Lett.*, 31:3086–3088, 2006.
- Lippitz M., M. A. van Dijk, y M. Orrit. Third-harmonic generation from single gold nanoparticles. *Nano letters*, 5(4):799–802, 2005.

- Long J., B. Simpkins, D. Rowenhorst, y P. Pehrsson. Far-field imaging of optical second-harmonic generation in single gan nanowires. *Nano letters*, 7(3):831–836, 2007.
- Ludwig M., M. Rief, L. Schmidt, H. Li, F. Oesterhelt, M. Gautel, y H. Gaub. Afm, a tool for single-molecule experiments. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 68(2):173–176, 1999.
- Magde D., E. Elson, y W. W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system-measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11):705, 1972.
- Magonov S. N. y D. H. Reneker. Characterization of polymer surfaces with atomic force microscopy. *Annual Review of Materials Science*, 27(1):175–222, 1997.
- Mahmoudi M., S. E. Lohse, C. J. Murphy, A. Fathizadeh, A. Montazeri, y K. S. Suslick. Variation of protein corona composition of gold nanoparticles following plasmonic heating. *Nano letters*, 14(1):6–12, 2013.
- Maier S. A. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer, 2007.
- Marcuse D. *Light transmission optics*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1982.
- Masip M. E. *Microscopía combinada de alta resolución. Aplicaciones a la plasmónica y la biofísica*. Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes 2160, C1428EGA, Buenos Aires, Argentina, 2011. An optional note.
- Masip M. E., A. A. Rieznik, P. G. König, D. F. Grosz, A. V. Bragas, y O. E. Martínez. Femtosecond soliton source with fast and broad spectral tunability. *Opt. Lett.*, 34(6):842–844, 2009.
- MathWorks . Matlab documentation. <http://www.mathworks.com/help/stats/boxplot.html>, 2015. An optional note.
- Mayilo S., M. A. Kloster, M. Wunderlich, A. Lutich, T. A. Klar, A. Nichtl, K. Kurzinger, F. D. Stefani, y J. Feldmann. Long-range fluorescence quenching by gold nanoparticles in a sandwich immunoassay for cardiac troponin t. *Nano letters*, 9(12):4558–4563, 2009.
- McConnell G. y E. Riis. Photonic crystal fibre enables short-wavelength two-photon laser scanning fluorescence microscopy with fura-2. *Physics in medicine and biology*, 49(20):4757, 2004.
- Medina M. A. y P. Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology. *Bioessays*, 24(8):758–764, 2002.
- Meyer G. y N. M. Amer. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied physics letters*, 53(12):1045–1047, 1988.
- Mierke C. T. The role of focal adhesion kinase in the regulation of cellular mechanical properties. *Physical biology*, 10(6):065005, 2013.
- Min W., C. W. Freudiger, S. Lu, y X. S. Xie. Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy. *Annual review of physical chemistry*, 62:507, 2011.
- Minsky M. Microscopy apparatus, 1961. US Patent 3,013,467.

Bibliografia

- Mitschke F. M. y L. F. Mollenauer. Discovery of the soliton self-frequency shift. *Opt. Lett.*, 11(10):659–661, 1986.
- Mivelle M., T. S. van Zanten, L. Neumann, N. F. van Hulst, y M. F. Garcia-Parajo. Ultrabright bowtie nanoaperture antenna probes studied by single molecule fluorescence. *Nano Letters*, 12(11):5972–5978, 2012. PMID: 23098104.
- Mivelle M., T. S. van Zanten, y M. F. Garcia-Parajo. Hybrid photonic antennas for sub-nanometer multicolor localization and nanoimaging of single molecules. *Nano Letters*, 14(8):4895–4900, 2014a. PMID: 25050445.
- Mivelle M., T. S. Van Zanten, C. Manzo, y M. F. Garcia-Parajo. Nanophotonic approaches for nanoscale imaging and single-molecule detection at ultrahigh concentrations. *Microscopy research and technique*, 77(7):537–45, 2014b.
- Mollenauer L. F., R. H. Stolen, y J. P. Gordon. Experimental observation of picosecond pulse narrowing and solitons in optical fibers. *Physical Review Letters*, 45(13):1095, 1980.
- Moy V. T., E.-L. Florin, y H. E. Gaub. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science*, 266(5183):257–259, 1994.
- Müller D. J. y Y. F. Dufrêne. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nature nanotechnology*, 3(5):261–269, 2008.
- Müller D. J., J. Helenius, D. Alsteens, y Y. F. Dufrêne. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nature chemical biology*, 5(6):383–390, 2009.
- Naik G. V., V. M. Shalaev, y A. Boltasseva. Alternative plasmonic materials: beyond gold and silver. *Advanced Materials*, 25(24):3264–3294, 2013.
- Natrajan V. y K. Christensen. Two-color laser-induced fluorescent thermometry for microfluidic systems. *Measurement Science and Technology*, 20(1):015401, 2009.
- Nishizawa N. y T. Goto. Compact system of wavelength-tunable femtosecond soliton pulse generation using optical fibers. *Photonics Technology Letters, IEEE*, 11(3):325–327, 1999.
- Nishizawa N., Y. Ito, y T. Goto. 0.78-0.90 μm Wavelength-Tunable Femtosecond Soliton Pulse Generation Using Photonic Crystal Fiber,. *IEEE Photon Technol. Lett.*, 14:986–988, 2002.
- Novotny L. y B. Hecht. *Principles of nano-optics*. Cambridge university press, 2012.
- Novotny L. y S. J. Stranick. Near-field optical microscopy and spectroscopy with pointed probes*. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 57:303–331, 2006.
- Novotny L. y N. van Hulst. Antennas for light. *Nature Photonics*, 5(2):83–90, 2011.
- Oberhauser A. F., C. Badilla-Fernandez, M. Carrion-Vazquez, y J. M. Fernandez. The mechanical hierarchies of fibronectin observed with single-molecule afm. *Journal of molecular biology*, 319(2):433–447, 2002.
- Ohiro Y., R. Arai, H. Ueda, y T. Nagamune. A homogeneous and noncompetitive immunoassay based on the enhanced fluorescence resonance energy transfer by leucine zipper interaction. *Analytical chemistry*, 74(22):5786–5792, 2002.

- Palero J., V. Boer, J. Vijverberg, H. Gerritsen, y H. J. C. M. Sterenborg. Short-wavelength two-photon excitation fluorescence microscopy of tryptophan with a photonic crystal fiber based light source. *Optics express*, 13(14):5363–8, 2005.
- Pellegrotti J. V., M. Caldarola, M. P. Kreuzer, E. Cortés, M. D. Bordenave, A. D. Sanchez, I. Ojea, A. V. Bragas, y F. D. Stefani. Homogeneous biosensing assay based on plasmonic photothermal fluorescence quenching using gold nanorods. En proceso de envío, 2015.
- Perkin Elmer . *SPCM-AQR: Single Photon Counting Module*. PerkinElmer, 22001 Dum-berry Road, Vaudreuil, QC, Canada, 1 edición, 2005. Hoja de datos.
- Peterman E. J., H. Sosa, y W. Moerner. Single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy of biomolecular motors. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 55:79–96, 2004.
- Pietrasanta L., A. Schaper, y T. Jovin. Imaging subcellular structures of rat mammary carcinoma cells by scanning force microscopy. *Journal of cell science*, 107(9):2427–2437, 1994.
- Pietrasanta L. I., D. Thrower, W. Hsieh, S. Rao, O. Stemmann, J. Lechner, J. Carbon, y H. Hansma. Probing the *saccharomyces cerevisiae* centromeric dna (cen dna)–binding factor 3 (cbf3) kinetochore complex by using atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7):3757–3762, 1999.
- Pohl D. Optical near-field scanning microscope, 1984. EP Patent App. EP19,820,111,974.
- Pohl D. W., W. Denk, y M. Lanz. Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$. *Applied Physics Letters*, 44(7), 1984.
- Pohl W. Optical near-field scanning microscope, 1986. US Patent 4,604,520.
- Punj D., M. Mivelle, S. B. Moparthi, T. S. van Zanten, H. Rigneault, N. F. van Hulst, M. F. Garcia-Parajo, y J. Wenger. A plasmonic /‘antenna-in-box/’ platform for enhanced single-molecule analysis at micromolar concentrations. *Nature Nanophotonics*, 8(7), 2013.
- Radmacher M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. *Methods in cell biology*, 68, 2002.
- Radmacher M. Measuring the elastic properties of biological samples with the afm. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, 16(2):47–57, 1997.
- Rai V. y N. Dey. *The Basics of Confocal Microscopy*, capítulo 5, páginas 75–96. InTech, The address of the publisher, 1 edición, 2011. DOI: 10.5772/16214.
- Ranka J. K., R. S. Windeler, y A. J. Stentz. Visible continuum generation in air-silica microstructure optical fibers with anomalous dispersion at 800 nm. *Optics Letters*, 25(1):25, 2000.
- Rief M., M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, y H. E. Gaub. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by afm. *science*, 276(5315):1109–1112, 1997a.
- Rief M., F. Oesterhelt, B. Heymann, y H. E. Gaub. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. *Science*, 275(5304):1295–1297, 1997b.

Bibliografia

- Rivetti C., C. Walker, y C. Bustamante. Polymer chain statistics and conformational analysis of dna molecules with bends or sections of different flexibility. *Journal of molecular biology*, 280(1):41–59, 1998.
- Rotsch C. y M. Radmacher. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophysical journal*, 78(1):520–535, 2000.
- Rotsch C., F. Braet, E. Wisse, y M. Radmacher. Afm imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. *Cell biology international*, 21(11):685–696, 1997.
- Russell P. Photonic crystal fibers. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5605):358–62, 2003.
- Saleh B. E. A. y M. C. Teich. *Fundamentals of Photonics*. John Wiley and Sons inc., 1991.
- Sanatinia R., S. Anand, y M. Swillo. Modal engineering of second-harmonic generation in single gap nanopillars. *Nano letters*, 14(9):5376–5381, 2014.
- Savage N. Supercontinuum sources. *Nature photonics*, 3:114–115, 2009.
- Scarpettini A. F., N. Pellegrini, y A. V. Bragas. Optical imaging with subnanometric vertical resolution using nanoparticle-based plasmonic probes. *Optics Communications*, 282(5):1032–1035, 2009.
- Schmidt W. Doppelbrechung der kernspindel und zugfasertheorie der chromosomenbewegung. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie Abt. B Chromosoma*, 1(1):253–264, 1939.
- Schonle A. Imspector image acquisition and analysis software, v0.10. <https://imspector.mpibpc.mpg.de/index.html> y da credito, 2006. <http://www.imspector.de>.
- Schuller J. A., T. Taubner, y M. L. Brongersma. Optical antenna thermal emitters. *Nature Photonics*, 3(11):658–661, 2009.
- Schwille P. y E. Haustein. Fluorescence correlation spectroscopy-an introduction to its concepts and applications. 2001.
- Schwille P., J. Korlach, y W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes. *Cytometry*, 36(3):176–182, 1999.
- Sheppard C. y T. Wilson. Image formation in confocal scanning microscopes. *Optik*, 55(4):331–342, 1980.
- Shimomura O., F. H. Johnson, y Y. Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59(3):223–239, 1962.
- Silberberg M. y A. R. Fukelman. Módulo de detección espectral. Informe de la Materia Laboratorio 6 y 7, Departamento de Física, FCEyN, Universidad de Buenos Aires, 2015. An optional note.
- Sirghi L., J. Ponti, F. Broggi, y F. Rossi. Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. *European biophysics journal : EBJ*, 37(6):935–45, 2008.

- Smith F. Microscopic interferometry. *Research (London)*, 8:385–395, 1955.
- Stiles P. L., J. A. Dieringer, N. C. Shah, y R. P. Van Duyne. Surface-enhanced raman spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 1:601–626, 2008.
- Stolen R. H. y C. Lin. Self-phase-modulation in silica optical fibers. *Phys. Rev. A*, 17(4):1448–1453, 1978.
- Sugimoto Y., P. Pou, M. Abe, P. Jelinek, R. Pérez, S. Morita, y O. Custance. Chemical identification of individual surface atoms by atomic force microscopy. *Nature*, 446(7131):64–67, 2007.
- Svoboda K. y R. Yasuda. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron*, 50(6):823–39, 2006.
- Synge E. Xxxviii. a suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 6(35):356–362, 1928.
- Takayanagi J., T. Sugiura, M. Yoshida, y N. Nishizawa. 1.0-1.7 μm wavelength-tunable ultrashort-pulse generation using femtosecond yb-doped fiber laser and photonic crystal fiber,. *IEEE Photon Technol. Lett.*, 18:659–661, 2006.
- Taminiau T., F. Stefani, F. Segerink, y N. Van Hulst. Optical antennas direct single-molecule emission. *Nature Photonics*, 2(4):234–237, 2008.
- Taminiau T. H., F. B. Segerink, y N. F. van Hulst. A Monopole Antenna at Optical Frequencies: Single-Molecule Near-Field Measurements. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, 55(11):3010–3017, 2007.
- Tang L., S. E. Kocabas, S. Latif, A. K. Okyay, D.-S. Ly-Gagnon, K. C. Saraswat, y D. A. Miller. Nanometre-scale germanium photodetector enhanced by a near-infrared dipole antenna. *Nature Photonics*, 2(4):226–229, 2008.
- Theer P., M. T. Hasan, y W. Denk. Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a ti: Al₂O₃ regenerative amplifier. *Optics letters*, 28(12):1022–1024, 2003.
- Tsien R. Y. The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67(1):509–544, 1998.
- Tsien R. Y. Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 48(31):5612–5626, 2009.
- Unruh J. R., E. S. Price, R. G. Molla, L. Stehno-Bittel, C. K. Johnson, y R. Hui. Two-photon microscopy with wavelength switchable fiber laser excitation. *Optics Express*, 14 (21):9825, 2006.
- Urban A., M. Fedoruk, M. Horton, J. Radler, F. Stefani, y J. Feldmann. Controlled nanometric phase transitions of phospholipid membranes by plasmonic heating of single gold nanoparticles. *Nano letters*, 9(8):2903–2908, 2009.
- Urban A. S., T. Pfeiffer, M. Fedoruk, A. A. Lutich, y J. Feldmann. Single-step injection of gold nanoparticles through phospholipid membranes. *ACS nano*, 5(5):3585–3590, 2011.

Bibliografia

- Vacano B. V., W. Wohlleben, y M. Motzkus. Actively shaped supercontinuum from a photonic crystal fiber for nonlinear coherent microspectroscopy. *Optics Letters*, 31(3): 413–415, 2006.
- Valeur B. *Molecular fluorescence: principles and applications*. John Wiley & Sons, 2001.
- Viani M., T. Schäffer, G. Paloczi, L. Pietrasanta, B. Smith, J. Thompson, M. Richter, M. Rief, H. Gaub, K. Plaxco, *et al.* Fast imaging and fast force spectroscopy of single biopolymers with a new atomic force microscope designed for small cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 70(11):4300–4303, 1999.
- Viani M. B., L. I. Pietrasanta, J. B. Thompson, A. Chand, I. C. Gebeshuber, J. H. Kindt, M. Richter, H. G. Hansma, y P. K. Hansma. Probing protein–protein interactions in real time. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(8):644–647, 2000.
- Vogel V. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 35:459–488, 2006.
- Vogel V. y M. Sheetz. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews molecular cell biology*, 7(4):265–275, 2006.
- von Ardenne M. B. Die praktische ausführung der elektronensonden-mikroskope. En: *Elektronen-Übermikroskopie*, páginas 231–253. Springer, 1940.
- von Bildering C. *Detección, localización y análisis de eventos singulares de reconocimiento molecular mediante microscopías avanzadas*. Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes 2160, C1428EGA, Buenos Aires, Argentina, 2013.
- von Bildering C., M. Calderola, M. E. Masip, A. V. Bragas, y L. I. Pietrasanta. Monitoring in real-time focal adhesion protein dynamics in response to a discrete mechanical stimulus. Enviado a PlosOne, 2015.
- Wallrabe H. y A. Periasamy. Imaging protein molecules using fret and flim microscopy. *Current opinion in biotechnology*, 16(1):19–27, 2005.
- Wang Y., J. Y.-J. Shyy, y S. Chien. Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 10:1–38, 2008.
- Washburn B., S. Ralph, P. Lacourt, J. Dudley, W. Rhodes, R. Windeler, y S. Coen. Tunable near-infrared femtosecond soliton generation in photonic crystal fibres. *Electronics Letters*, 37(25):1510–1512, 2001.
- Webb R. H. Confocal optical microscopy. *Reports on Progress in Physics*, 59(3):427, 1996.
- Yang T., G. A. Lessard, y S. R. Quake. An apertureless near-field microscope for fluorescence imaging. *Applied Physics Letters*, 76(3):378–380, 2000.
- Yu C.-h., J. B. K. Law, M. Suryana, H. Y. Low, y M. P. Sheetz. Early integrin binding to arg-gly-asp peptide activates actin polymerization and contractile movement that stimulates outward translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (51):20585–20590, 2011.
- Zaidel-Bar R., M. Cohen, L. Addadi, y B. Geiger. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society Transactions*, 32(3):416–420, 2004.

- Zaidel-Bar R., S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, y B. Geiger. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature cell biology*, 9(8):858–867, 2007.
- Zamir E. y B. Geiger. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science*, 114(20):3583–3590, 2001.
- Zamir E., M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K. M. Yamada, B.-Z. Katz, S. Lin, D. C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, *et al.* Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nature cell biology*, 2(4):191–196, 2000.
- Zernike F. Das phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen beobachtung. *Z. Tech. Phys*, 16:454–457, 1935.
- Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, 9(7):686–698, 1942.
- Zheltikov A. M. Time-resolved coherent Raman and sum-frequency generation spectroscopy with wavelength-tunable , short-pulse , photonic-crystal fiber light sources. (April): 1052–1063, 2007.
- Zijlstra P., P. M. Paulo, y M. Orrit. Optical detection of single non-absorbing molecules using the surface plasmon resonance of a gold nanorod. *Nature nanotechnology*, 7(6): 379–382, 2012.
- Zipfel W. R., R. M. Williams, y W. W. Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature biotechnology*, 21(11):1369–77, 2003.
- Zumbusch A., G. R. Holtom, y X. S. Xie. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes raman scattering. *Phys. Rev. Lett.*, 82:4142–4145, 1999.

Agradecimientos

Estos párrafos están dedicados a agradecer a todas las personas que hicieron posible que hoy esté escribiendo estas líneas finales, que representa el cierre de una etapa y el comienzo de otra. No creo que sean suficientes para agradecer todo lo que su apoyo significó para mí.

En primer lugar quiero agradecer a Andrea, quien supo guiarme en todos estos años, desde que comencé en el LEC hasta ahora. Quiero agradecerle por estar incondicionalmente, porque siempre me ayudó a crecer y a ser mejor profesional. Sin su apoyo, dedicación, guía y enseñanzas nada de esto sería posible.

En segundo lugar quiero agradecer a todo el LEC. Cuando digo esto me refiero a toda la gente que hace del laboratorio un excelente lugar de trabajo, donde se combinan la pasión por hacer ciencia con la calidez humana. En particular a todos los compañeros (algunos todavía están, otros ya continuaron su camino), que compartieron buena parte de su tiempo conmigo en estos años: Martín, Francisco, Esteban, Alberto, Laura, Pablo, Gaby, Fabricio, Edu y Maxi. Quiero agradecerle especialmente a Hernán que siempre estuvo con su palabra de aliento o ayuda técnica para salir de apuros. Tampoco puedo dejar de agradecerle a Gustavo, un gran compañero en estos últimos años, quien supo soportarme trabajando día a día y con quien espero poder seguir trabajando en el futuro.

También quiero agradecer a nuestros colaboradores, ya que sin ellos no podría haber llegado a este punto. Para los experimentos de biología tengo que agradecer de manera especial a Lía por su generosidad y su guía y a Catalina por ser una compañera de lujo; trabajar con ellas realmente se disfruta. Quiero agradecer a Fernando Stefani y a todo su grupo: Jésica, Federico, Julián y Martín, que siempre estuvieron para intercambiar ideas, discutir de ciencia y acompañar en lo personal. Quiero agradecer a Mark por el tiempo compartido y por sus consejos. Quiero agradecer también a toda la gente del grupo de Nanofotónica del Imperial College, que me recibieron con los brazos abiertos cuando los visité. En particular a Stefan, Mohsen, Pablo, Tyler y muy especialmente a Emiliano, que me soportó de manera incondicional en momentos adversos.

Debo agradecer a Diego Grosz por aconsejarme y acompañarme durante estos años; fue muy gratificante (y lo seguirá siendo) poder compartir y aprender con él.

Es imposible no dedicar unas líneas a agradecer a toda la gente que, con esfuerzo y dedicación cotidianas, hacen del Departamento de Física un lugar de trabajo excepcional.

No puedo dejar de agradecer a mis compañeros de carrera que, aunque han seguido diversos caminos (algunos bastante lejos), siempre están presentes de una u otra manera:

Aquiles, Agos, Marce, Pablo, Andy, Chuse, Leandro y Marco.

Por último quiero agradecer a toda mi familia. A Papá, a Mamá y a mis hermanos, que siempre supieron entenderme, acompañarme y aconsejarme, sobre todo en los momentos difíciles y de decisiones complicadas. A mis suegros y cuñados, que siempre estuvieron para brindar su apoyo y dar una palabra de aliento.

Finalmente, las últimas líneas de estos agradecimientos son para la persona que hizo esto posible en todos los sentidos: Pato, gracias por acompañarme, apoyarme y por compartir todo conmigo.

;Gracias a todos!

Martín