



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

# **Determinación de orientación y distancia de nanodímetros metálicos**

**Hernán Edgardo Grecco**

Director de Tesis: **Oscar E. Martínez**

Lugar de Trabajo: **Laboratorio de Electrónica Cuántica**

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

## Resumen

En la presente tesis se propone una técnica que permite caracterizar un dímero compuesto por nanopartículas metálicas, midiendo su orientación en el plano y la distancia entre las partículas que lo componen. Dado que la información está codificada en la respuesta electromagnética del dímero, no es preciso resolver las partículas individualmente.

Se muestra que la sección eficaz de *Scattering* del dímero depende fuertemente de la polarización de la luz incidente y de la distancia entre las nanopartículas. Se introduce una modificación a un microscopio de reflexión total interna que permite tomar imágenes de la muestra para distintas polarizaciones incidentes. Se implementa conjuntamente una técnica basada en la detección diferencial a dos longitudes de onda que permite distinguir las nanopartículas de otros centros de Scattering.

Midiendo distancias por debajo del límite de difracción en dímeros formados por nanopartículas depositadas en vidrio se demuestran la factibilidad de la técnica.

**Palabras Clave:** microscopía, Scattering, acople electromagnético, nanopartículas metálicas, dímeros, orientación, distancia, reflexión total interna.

# **Distance and orientation determination of metallic nanodimers**

## **Abstract**

In this thesis a novel technique that is able to characterize single dimers by measuring its orientation and the distance between the nanoparticles is presented. Due to the fact that it is based on the electromagnetic response of the dimer, it is not necessary to optically resolve the individual particles.

It is shown that the Scattering cross section of a dimer strongly depends on the incident polarization and on the distance between the nanoparticles. In order to take images of the sample for different incident polarizations, an adaptation to a total internal reflection microscope is presented. In addition, a new technique based on the differential wavelength detection is implemented to make it easier to distinguish nanoparticles from other Scattering centers.

Finally, the capability of a technique to measure distances below the diffraction limit for dimers formed by deposition of nanoparticles over glass is demonstrated experimentally.

**Keywords:** microscopy, Scattering, electromagnetic coupling, metallic nanoparticles, dimers, orientation, distance, total internal reflection.



*A Pachi y Francisco*

# Índice

1. Introducción .....	7
1.1. Resolución y contraste .....	7
1.2. Microscopía de Fluorescencia .....	11
1.3. Localización .....	13
1.4. Mediciones intrínsecas de distancia y orientación .....	14
1.5. Limitaciones de la fluorescencia .....	16
1.6. Scattering.....	17
1.7. Esquema la tesis .....	19
2. Scattering de partículas metálicas .....	21
2.1. Aproximación Dipolar.....	24
2.2. Aproximación dipolar para partículas acopladas .....	26
2.3. Scattering de Mie .....	31
2.4. Scattering de Mie para partículas acopladas .....	36
2.4.a. Acerca de la resolución numérica de GMMie.....	39
2.4.b. Resultados de GMMie para el caso de dos partículas.....	40
2.5. Otros formalismos multipolares .....	42
2.6. Comparación con otro formalismo no multipolar .....	43
3. Dispositivo Experimental.....	44
3.1. Iluminación.....	47
3.2. Posicionamiento del haz.....	49
3.3. Detección.....	52
4. Adquisición, Resultados y Análisis.....	59
4.1. Preparación de las muestras .....	59
4.2. Adquisición .....	60
4.3. Análisis de las imágenes .....	61
4.4. Resultados .....	63
4.5. Incertezas experimentales .....	70
4.6. Ajuste .....	72
4.7. Discusión.....	74
5. Conclusiones .....	76
5.1. Perspectivas.....	77
Apéndice.....	81
Bibliografía.....	84

*En este capítulo se presenta el estado del arte en microscopía exponiendo sus principales conceptos, alcances y limitaciones. Luego se discute la motivación del presente trabajo y finalmente se brinda un esquema del mismo.*

## **1. Introducción**

La microscopía como técnica ha aportado información relevante en casi todos los campos de la ciencia empujando los límites de lo resoluble desde 0,1 mm -un número típico para el ojo humano- a dimensiones cada vez más pequeñas. En particular, durante el siglo pasado, se realizaron una serie de descubrimientos en el área de la biología que permitieron comprender por primera vez los principios básicos de la vida. Estos hallazgos fueron posibles porque la microscopía además de un medio es un fin. Desde la construcción de las primeras lupas hasta los modernos microscopios confocales, el desarrollo de dispositivos que permiten explorar el universo a escalas submilimétricas ha avanzado siguiendo -y a veces anticipando- las necesidades de las disciplinas científico-técnicas.

A partir de la comprensión de los procesos físicos involucrados en el proceso de hacer imagen y de la interacción de la luz con el objeto observado, se han desarrollado numerosas técnicas con el objetivo de mejorar la resolución y el contraste.

En la siguiente sección se comentan algunas de estas técnicas que serán importantes para considerar la relevancia de esta tesis.

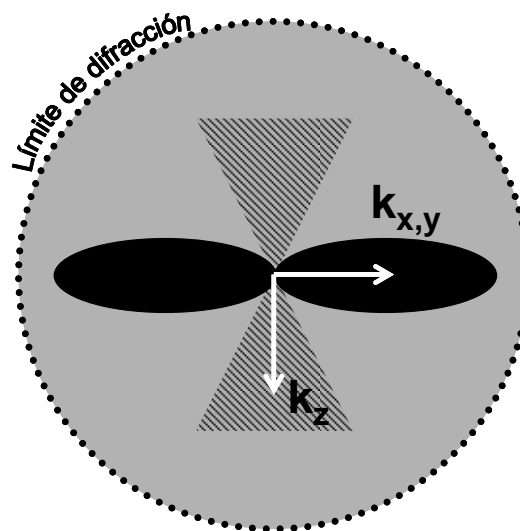
### **1.1. Resolución y contraste**

Un objeto y su imagen no son idénticos. Como es bien sabido, la óptica lineal está limitada por la difracción. Dos puntos muy próximos no podrán distinguirse, es decir resolverse, por generar en la imagen sendos discos de Airy

que se solapan. Esta figura es la respuesta al impulso (PSF<sup>1</sup>) del sistema óptico. La imagen de un objeto será la convolución de éste con la PSF del microscopio.

Para tratar la resolución de un microscopio es útil pensar en el espacio recíproco de los vectores de onda ( $k$ ).<sup>2</sup> La transformada de Fourier de la PSF se denomina función óptica de transferencia (OTF<sup>3</sup>) y da cuenta de las frecuencias espaciales que son transferidas del objeto a la imagen. Los puntos donde la OTF no es nula definen el área de soporte o ancho de banda del sistema. La resolución, como capacidad de resolver una estructura, está directamente relacionada con la posibilidad de transferir las frecuencias espaciales que la forman y queda definida por la OTF.

En la **Figura 1-1** se observa la OTF de un microscopio convencional (negro) superimpuesta al límite de difracción (gris).<sup>4</sup> Por la simetría del sistema óptico, la OTF tiene simetría de revolución alrededor del  $k_z$  (axial).



**Figura 1-1. OTF de un microscopio convencional.** La OTF de un microscopio da cuenta de las frecuencias espaciales que son transferidas del objeto a la imagen. Por la simetría del sistema óptico, la OTF es invariante ante rotaciones alrededor del  $k_z$ . En gris se muestran todas las frecuencias espaciales que serían transferidas tomando en cuenta únicamente el límite de difracción y en negro la región de soporte de un microscopio convencional. No sólo se observa que esta última es mucho menor sino que le falta un cono (región rayada) en  $k_z$  indicando la imposibilidad que tiene el microscopio convencional de seccionar ópticamente en la dirección de propagación del haz.

<sup>1</sup> Del inglés Point Spread Function

<sup>2</sup> Goodman 2004

<sup>3</sup> Del inglés Optical Transfer Function

<sup>4</sup> Gustafsson 2003



Tomando en cuenta únicamente el efecto de la difracción se puede decir que el microscopio funciona como un filtro pasabajo. Dado que se han perdido los  $k$  más altos, la imagen contiene menos información que el objeto y carece de los detalles más pequeños. La separación mínima en el espacio real para poder distinguir los puntos es del orden de la longitud de onda ( $\lambda$ ). Sin embargo, el área de soporte es menor que el límite impuesto por la difracción y en la dirección transversal ( $x,y$ ) está relacionada con la apertura numérica del objetivo utilizado. A mayor apertura numérica del objetivo (NA)<sup>1</sup>, mayor el área de soporte. Se puede alcanzar en la práctica el límite de difracción con un objetivo de buena calidad y alta apertura numérica

La ausencia en el área de soporte del cono en  $k_z$  impide - independientemente de la NA del objetivo- seccionar ópticamente en la dirección de propagación del haz en un microscopio convencional. En la interpretación en el espacio real, la imagen no sólo contiene la luz del plano focal del objetivo sino también la que proviene de planos adyacentes.

El contraste de una muestra que es observada por transmisión está dado por la dispersión de la luz al pasar por medios de distintos índices de refracción ( $n$ ). En el espacio recíproco, está dado por la amplitud relativa de los  $k$ . Cuando se observan muestras biológicas, formadas mayormente por agua, el contraste que se obtiene es generalmente pobre dado que no existen dentro de las mismas grandes diferencias de índice de refracción. Para poder mejorarlo se utilizan diversas técnicas.

En primer lugar podemos mencionar aquellas que se valen de un esquema de iluminación y detección. Los más importantes exponentes de este grupo son la microscopía por Contraste de Fase<sup>2</sup> (CF) y la microscopía por Contraste Diferencial Interferométrico (DIC<sup>3</sup>). En CF, desarrollada en 1934 por F. Zernike, se ilumina la muestra a través de un anillo y se realiza la detección bloqueando la luz que pasa por ella sin desviarse. De esta forma sólo llega al detector la luz dispersada que es

---

<sup>1</sup> La apertura numérica (NA, del inglés numerical aperture), definida como el producto entre índice de refracción después del objetivo y el seno del ángulo máximo de aceptación, da cuenta de cuales son los  $k$  que se transfieren de la muestra al objetivo.

<sup>2</sup> Del inglés Differential Interference Contrast. Zernike 1942.

<sup>3</sup> Nomarski 1955

la que contiene información relevante. En DIC, se incide en la muestra con dos haces en puntos muy próximos (irresolubles). Luego estos haces son recombinados e interfieren de forma tal que la pequeña diferencia de camino óptico debido a cambios de medio o rugosidades de la muestra se transforma en una diferencia de intensidad. Así se obtiene una imagen donde las variaciones de la muestra son realizadas.

En segundo lugar encontramos las técnicas de tinción y marcación que se basan en marcar selectivamente estructuras celulares con sustancias que aumenten su contraste. Muchas partes de la célula como el complejo de Golgi y los cromosomas se descubrieron gracias a la selectividad que mostraban estas estructuras al teñirse con diferentes materiales.<sup>1</sup> Uno de los aspectos más importantes de estas técnicas es la selectividad de la marcación. Actualmente gran parte del trabajo bioquímico en microscopía está centrado en el desarrollo de marcadores biocompatibles y específicos para distintas partes de la célula.

Los marcadores más usados en la actualidad son las sondas fluorescentes. Estos compuestos tienen la particularidad de hacer una transición a un estado excitado por la absorción de luz de una longitud de onda (llamada de excitación  $\lambda_{ex}$ ) y, previos decaimientos no radiativos, reemitir en una longitud de onda mayor (llamada de emisión  $\lambda_{em}$ ). Se encuentran disponibles muchos tipos de sondas de distintos tamaños y con gran variedad de propiedades ópticas<sup>2</sup>, desde pequeñas moléculas orgánicas<sup>3</sup> hasta grandes proteínas fluorescentes<sup>4</sup> pasando por nanocristales semiconductores (Quantum Dots - QD).<sup>5</sup> Entre sus propiedades más importantes se destacan las ya mencionadas  $\lambda_{em}$  y  $\lambda_{ex}$ , el tiempo de vida del estado excitado ( $\tau$ ) y la eficiencia cuántica ( $\eta_q$ ) definida como el número de fotones emitidos normalizado por el número de fotones recibidos. Un aspecto importante de los fluoróforos es su fotoestabilidad. Por diversos mecanismos, al ser irradiados

---

<sup>1</sup> De hecho la palabra cromosoma significa literalmente cuerpo coloreado y fue elegido por que tomaba un color muy fuerte al ser teñida la célula. Su función biológica se descubrió mucho tiempo después.

<sup>2</sup> Lakowicz 1983

<sup>3</sup> Zhang 2002

<sup>4</sup> Tsien 1998

<sup>5</sup> Grecco 2004

con luz, pasan irreversiblemente a un estado oscuro. Una forma útil de cuantificarla es definiendo  $N$  como el número medio de fotones disponibles antes de fotoblanquearse.

## **1.2. Microscopía de Fluorescencia**

La aparición de los marcadores anteriormente mencionados dio lugar a la microscopía por fluorescencia convencional y a nuevas formas de aumentar la resolución. Los microscopios de fluorescencia pueden ser divididos en dos grandes grupos. Por un lado están aquellos donde la muestra es barrida por un haz láser y se colecta secuencialmente la luz que emite cada punto. En un segundo grupo están aquellos donde la imagen se captura con una cámara siendo la adquisición simultánea para toda la muestra.

Dentro de los microscopios de barrido y entre los más utilizados en biología se encuentra el microscopio confocal<sup>1</sup> que permite seccionar ópticamente la muestra en la dirección de propagación del haz. La técnica consiste en utilizar un iris en el plano conjugado del plano focal del objetivo de forma tal de colectar sólo la luz proveniente de la zona de la muestra en foco rechazando el resto. Si bien la resolución lateral no se verá mejorada significativamente, la axial dependerá fuertemente del tamaño del iris. En el caso límite de que esté totalmente abierto, el microscopio se comportará como uno convencional. En la **Figura 1-2** se observa la OTF de un microscopio confocal. La capacidad de seccionamiento óptico viene dada por la inclusión de la dirección axial en el área de soporte.

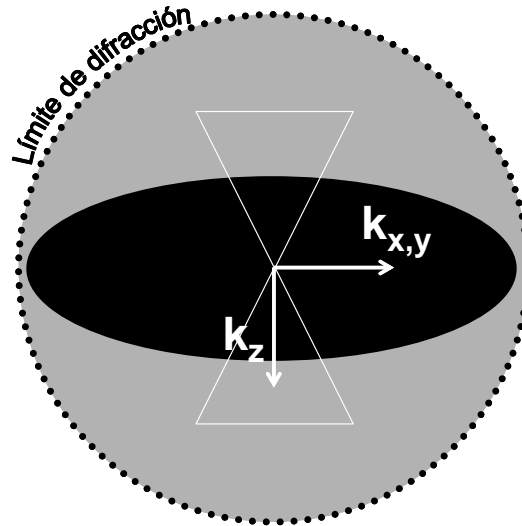
Otro sistema que permite el seccionamiento óptico es el microscopio por absorción de dos fotones.<sup>2</sup> En este caso la detección es igual a la del convencional de barrido pero la excitación se realiza con un láser infrarrojo de pulsos cortos. Dado que la energía de los fotones es menor, hacen falta dos fotones en el mismo lugar y en el mismo momento para excitar la molécula fluorescente. La probabilidad de que esto ocurra sólo es significativa en el foco del objetivo por lo que al barrer únicamente se excita el plano focal de la muestra. Tiene varias ventajas frente al confocal, entre ellas la mayor distancia de penetración de la luz por la mayor longitud de onda utilizada y el menor fotodaño a la muestra por

---

<sup>1</sup> White 1987

<sup>2</sup> Konig 2000

excitar sólo el foco en lugar de todo el cono de iluminación. Sin embargo su uso en biología no está tan difundido por el costo de los láseres y la mayor complejidad de éstos.



**Figura 1-2. OTF de un microscopio confocal.** A diferencia de un microscopio convencional, en uno confocal el área de soporte incluye la dirección  $z$  (axial). Este hecho es lo que permite seccionar ópticamente la muestra. Ajustando el tamaño del iris puede aumentarse o disminuirse la transferencia en esta dirección.

Dentro del grupo de los que funcionan con cámaras, el microscopio de fluorescencia por reflexión total interna (TIRF)<sup>1</sup> es el más utilizado para aumentar la resolución axial. Dado que el índice de refracción de una muestra biológica (aire, agua) es siempre menor a la del cubreobjeto (vidrio) existe un ángulo de incidencia a partir del cual la luz no se refracta y genera en la muestra una onda evanescente. Esta excitación decae rápidamente ( $\sim 100$  nm) a medida que aumenta la distancia a la interfase, por lo que puede considerarse que sólo se excita la parte lindante con el cubreobjeto. A pesar de estar limitada sólo a una región axial de la muestra, esta técnica está muy difundida en el estudio de membranas celulares sobre vidrio. En el capítulo 3 se darán más detalles de esta configuración que por motivos que se explicarán mas adelante fue la elegida para el desarrollo de esta tesis

Mediante el uso de las técnicas arriba mencionadas en conjunto con métodos computacionales de reconstrucción de imágenes se ha llegado a una resolución de 200 nm.

<sup>1</sup> Del inglés total internal reflection fluorescence. Axelrod 1984, Axelrod 2001

### 1.3. Localización

Para resolver ópticamente estructuras menores a 200 nm existen otras técnicas como I5M<sup>1</sup>, 4Pi<sup>2</sup>, STED<sup>3</sup> y Saturated Patterned Excitation<sup>4</sup>, las cuales utilizando diversos métodos de iluminación y colección rompen con la barrera impuesta por la difracción. Sin embargo su uso no se encuentra muy difundido porque son costosas, complicadas de implementar y de difícil uso en sistemas biológicos.<sup>5</sup> Esto no ha sido un impedimento para obtener información en esa escala, ya que en muchos casos no es necesario resolver sino tener la habilidad de identificar y localizar marcadores individuales con precisión de unos pocos nanómetros.

Cuando la densidad de sondas fluorescentes es baja de forma tal que la distancia entre dos es siempre mayor que el límite resoluble es posible utilizar técnicas de ajuste para ubicarlos en el plano con altísima precisión. La técnica consiste en ajustar la imagen obtenida con la convolución de la PSF del microscopio y una estimación de la muestra. Cuando el tamaño de ésta es mucho menor que  $\lambda$ , puede considerarse una *delta*, y la convolución con la PSF es la PSF, que se mide en el mismo microscopio con un experimento auxiliar. La precisión del ajuste depende fuertemente de la relación señal ruido, llegándose a ubicar moléculas individuales con precisión de unos pocos nanómetros.<sup>6</sup>

Esta técnica puede extenderse a la localización de pocas partículas con diferentes propiedades fotofísicas tales como la longitud de emisión<sup>7</sup>, el tiempo de vida o la fotoestabilidad. Desafortunadamente, en aquellas en las que se utilizan diferencias espectrales sufren de aberraciones cromáticas. El uso del fotoblanqueo como medio vuelve inútil a la muestra una vez que se hizo la imagen. También se ha utilizado el *blinking* de los QD como mecanismo para distinguir -y por lo tanto

---

<sup>1</sup> Gustafsson 1999

<sup>2</sup> Hell 2006

<sup>3</sup> Hell 1994, Klar 2001

<sup>4</sup> Heintzmann 2002

<sup>5</sup> Además recién el año pasado han aparecido los primeros prototipos comerciales.

<sup>6</sup> Yildiz 2003, Ober 2004

<sup>7</sup> Esa 2000

localizar- dos partículas muy próximas.<sup>1</sup> Pero esta técnica está limitada a fluoróforos fijos o de movimiento lento, ya que es necesaria una secuencia temporal de imágenes de la misma muestra. Recientemente<sup>2</sup> se ha logrado localizar marcadores fluorescentes con precisión de unos pocos nanómetros en una muestra fijada con alta densidad de ellos. La técnica consiste en fotoactivar un número escaso de marcadores antes de cada imagen de forma tal que la densidad efectiva sea pequeña. Una vez tomada la imagen se fotoblanquea los marcadores activados y se comienza el ciclo nuevamente. Al cabo de un número grande de exposiciones se cuenta con la posición de cada una de las moléculas. Como se desprende de la explicación, la secuencia puede tomar horas para reconstruir una única imagen.

Es claro que de poder localizarse dos marcadores puede conocerse la distancia entre ellos y su orientación relativa. Sin embargo, como fue expuesto anteriormente, existen muchos casos en que no es posible hacerlo y de serlo la resolución temporal o espacial no es suficiente. En estos casos es útil contar con una técnica donde estas propiedades del dímero -distancia y orientación- estén codificadas en la imagen independientemente de poder resolver o localizar los marcadores que lo forman.

#### **1.4. Mediciones intrínsecas de distancia y orientación**

Con la palabra “intrínsecas” se quiere referir a técnicas donde la información de interés dependa de una interacción entre las partes que componen la muestra. La más usada en biología para medir distancias es la Transferencia de Energía Resonante Fluorescente<sup>3</sup> (FRET<sup>4</sup>) descrito por Förster<sup>5</sup> a fines de los 50 y empleada como regla molecular 10 años después por Stryer y Haugland.<sup>6</sup> Se basa en el hecho que dos dipolos interactúan sólo si están ubicados lo suficientemente cerca -típicamente distancias menores a 10 nm-. En esa circunstancia existe la probabilidad de que el dipolo excitado -llamado donador- transfiera no radiativamente energía al dipolo no excitado -llamado aceptor-. De esta forma, si

---

<sup>1</sup> Lidke 2005

<sup>2</sup> Betzig 2006

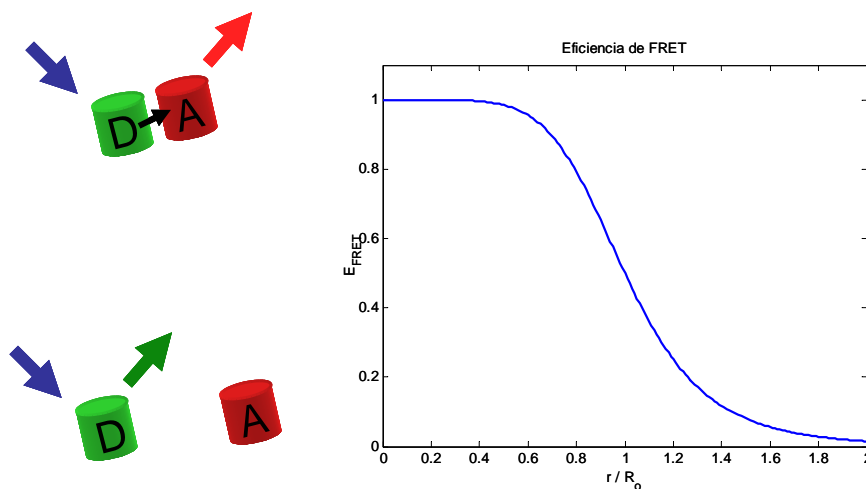
<sup>3</sup> Selvin 2000

<sup>4</sup> Del inglés Fluorescence/Förster Resonance Energy Transfer.

<sup>5</sup> Förster 1959

<sup>6</sup> Stryer 1967

se marcan las proteínas de interés con sondas fluorescentes puede detectarse su interacción a través de la señal de FRET. Una de las formas más simples de medir FRET consiste en iluminar la muestra con una longitud de onda que sólo excite el donador y detectar la fluorescencia a una longitud de onda donde únicamente emita el aceptor. Llamaremos a canal DA o canal de FRET a esta configuración. Se detectará señal en este canal exclusivamente cuando las proteínas marcadas interactúen, ya que sólo entonces estarán lo suficientemente cerca como para que la transferencia de energía sea considerable.



**Figura 1-3. Esquema de FRET.** La eficiencia de la transferencia de energía entre dos sondas depende de la distancia entre ellas (ver texto). Se define  $R_0$  como la distancia a la que FRET es 50% eficiente y para la mayoría de los pares es del orden 5 nm. Cuando la distancia es mucho mayor que  $R_0$  la eficiencia de FRET es despreciable y al excitar el Donor sólo se detecta la fluorescencia de éste. Para distancias pequeñas, al excitar el Donor se detecta la fluorescencia del Aceptor.

En la **Figura 1-3** se observa la eficiencia de la transferencia de energía en función de la distancia en unidades de la distancia de Förster ( $R_0$ ), definida como la separación a la que el FRET es 50% eficiente. Para la mayoría de los pares  $R_0$  está entre 2 y 6 nm, limitando a unos 10 nm la máxima distancia medible.<sup>1</sup> A apartamientos mayores la sensibilidad del método (asociado con la pendiente de la curva de la figura) es tan pequeña que la relación señal-ruido hace imposible obtener información.

<sup>1</sup> Wu 1994

Desde su primer uso como “regla” a fines de los ‘60, se ha continuado usando FRET para medir distancias absolutas,<sup>1</sup> pero la cantidad de parámetros difíciles de controlar o de medir tales como la orientación relativa de los dipolos de absorción y emisión hacen que se use preferentemente para indicar interacción entre macromoléculas.

FRET no brinda información acerca de la orientación del par en el espacio. Para lograr esto existe una técnica que consiste en aprovechar el hecho de que la emisión de un dipolo depende de su orientación. Si se hace una imagen del fluoróforo levemente desenfocado puede, además de la ubicación, conocerse la orientación en el espacio del dipolo de emisión ajustando la imagen obtenida por el perfil de radiación del mismo en campo lejano. Esta técnica se ha aplicado al estudio de motores moleculares pudiéndose obtener el ángulo de ataque del brazo del motor midiendo de la orientación del dipolo y el tamaño del paso calculando la distancia entre dos pasos sucesivos.<sup>2</sup> Es importante mencionar que por este método es posible determinar la dirección del dipolo, no así la orientación entre dos puntos cualesquiera. Por este motivo, la molécula fluorescente deberá ser ligada a la orientación de interés por medios bioquímicos.

No existen en la literatura técnicas totalmente ópticas para medir intrínsecamente la distancia entre dos puntos y simultáneamente su orientación en el espacio en el rango no resoluble por la óptica de campo lejano.

### **1.5. Limitaciones de la fluorescencia**

Como se mencionó anteriormente, el número de fotones que emite una sonda fluorescente antes de blanquearse irreversiblemente limita la duración máxima del ensayo y obstaculiza su aplicación en experimentos que requieren un seguimiento prologando. Nuevas sondas y técnicas se han utilizado pero, nos encontramos aún lejos del fluoróforo eterno.

El otro punto importante es que el estado excitado de los fluoróforos tiene un tiempo de vida que limita la tasa a la cual puede absorber y, por lo tanto, emitir fotones. Por este motivo, al aumentar la potencia de excitación se llega a una saturación a partir de la cual el número de fotones por unidad de tiempo que el

---

<sup>1</sup> Lee 2005

<sup>2</sup> Syed 2006, Toprak 2006



fluoróforo emite es constante. Esto deja como único camino posible para mejorar la relación señal-ruido aumentar el tiempo de integración, disminuyendo así la resolución temporal del experimento.

El tiempo de vida promedio de las moléculas fluorescentes es de 10 nanosegundos, obteniéndose un máximo de  $10^8$  fotones/s. Es decir que suponiendo una eficiencia de colección del objetivo del 30% y de los detectores del 40% y con pérdidas del 20% a lo largo del camino óptico, se detectan sólo 10% de los fotones obteniéndose  $10^7$  fotones en una imagen de 10 milisegundos. Si la imagen del fluoróforo es de 25x25 píxeles se detectan  $N=160$  fotones por cada píxel. Teniendo en cuenta que el ruido de conteo sigue una estadística de Poisson, la varianza va como  $\sqrt{N} \approx 12$ . Estos números representan el caso óptimo en el y en la realidad es menor. Esto dificulta enormemente la localización de fluoróforos con alta precisión y resolución temporal en experimentos de molécula única y fluoróforo único.

Además para el caso de la rodamina, un colorante muy utilizado, el número total de fotones que emite en solución es del orden de  $10^9$  por lo que estará inservible después de un segundo de exposición a potencia de saturación.

## 1.6. *Scattering*<sup>1</sup>

La microscopía por Scattering no ha sido desarrollada a los niveles de la fluorescencia. Uno de los motivos es el tamaño de las nanopartículas. Si bien existen comercialmente nanopartículas monodispersas muy pequeñas (hasta 1.4 nm), estas son imposibles de observar ópticamente por su pequeña sección eficaz. En microscopía óptica se suelen usar partículas con tamaños a partir de los 20 nm comparativamente muchos mayores a las sondas orgánicas utilizadas tradicionalmente.

Sin embargo, el uso intensivo en los últimos años en biología de proteínas fluorescente y sobre todo Quantum Dots, cuyo diámetro es del orden de 20 nm, ha mostrado que aun con sondas de ese tamaño muchas biomoléculas son internalizadas por la célula y continúan funcionales. Las nanopartículas metálicas son entonces una opción biocompatible, disponible comercialmente, conjugada a

---

<sup>1</sup> Al no existir consenso en la comunidad científica hispanoparlante, se usará la globalmente aceptada palabra inglesa *Scattering* en lugar de esparcimiento o dispersión.

distintos *linkers* y con propiedades electromagnéticas que, como se demostrará en esta tesis, pueden ser utilizadas para medir orientación y distancia.

Pero el principal motivo de su escasa difusión es que carece de uno de los elementos más útiles de la fluorescencia: la separación espectral entre excitación y emisión, que brinda una forma simple de separar la señal del fondo. Si bien es cierto que existen otras fuentes de “fondo” (autofluorescencia del vidrio/medio/muestra, tinción no específica, etc.), la más intensa es la reflexión del haz de excitación. Dado que el Scattering es un proceso elástico, la longitud de onda de los fotones “emitidos” es igual a la de los fotones “absorbidos” por lo que no es posible separar espectralmente la señal del fondo.

A pesar de esta desventaja existen otros aspectos que hacen la microscopía por Scattering un complemento interesante, a saber:

1. Estabilidad de la sonda: como fue mencionado anteriormente las sondas fluorescentes tarde o temprano se degradan irreversiblemente. Las nanopartículas metálicas no se fotodegradan a las potencias que se suelen usar en la biología permitiendo realizar experimentos de duración indefinida.<sup>1</sup>
2. Alta tasa de “emisión”: dado que el proceso no involucra estados electrónicos con tiempo de vida la “emisión” no satura. De esta forma el número de fotones por unidad de tiempo no está limitado, pudiéndose realizar experimentos con alta resolución temporal.<sup>2</sup>
3. Resonancia: el Scattering de una nanopartícula metálica presenta una resonancia del plasmón fuertemente dependiente de la forma, el tamaño, el material y el medio. El espectro de esta resonancia brinda una *firma* que permitiría distinguir al Scattering de las nanopartículas del fondo.
4. Acoplamiento a grandes distancias: de forma similar a lo que ocurría en caso de FRET, cuando dos sondas estén “cerca”, se “verán” electromagnéticamente y el Scattering dependerá de la iluminación y la configuración. A diferencia del FRET donde las distancias de interacción son de algunos nanómetros, la distancia típica del acople electromagnético de partículas metálicas esta fuertemente relacionada con el radio de las

---

<sup>1</sup> Suzuki 2004

<sup>2</sup> Suzuki 2005

mismas. De este modo se puede seleccionar el rango de interés seleccionando el tamaño de partícula.

Este último punto se ha usado muy recientemente<sup>1</sup> como regla molecular para medir distancias del orden de 70 nm entre nanopartículas metálicas de 40 nm de diámetro. La técnica se basa en el hecho que el acople electromagnético produce un corrimiento del espectro del dímero respecto del espectro del monómero dependiente de la distancia interpartícula. De la medición del espectro puede obtenerse entonces la distancia entre las partículas que forman el dímero.

### **1.7. Esquema la tesis**

En esta tesis se desarrolló e implementó un método basado en Scattering de dos partículas acopladas para medir orientaciones en el plano y distancias menores que 100 nm. Utiliza una propiedad no explorada previamente: la sensibilidad del Scattering a la polarización del campo incidente. La existencia de una dirección privilegiada -la que une ambas partículas- hace que la respuesta electromagnética dependa sensiblemente de la polarización de la onda incidente. Se mostrará teórica y experimentalmente que la información de la distancia entre las partículas que forman el dímero está codificada en la modulación que presenta la señal al rotar la polarización y que la orientación puede obtenerse buscando el máximo. Se mostrará también que la dependencia espectral puede utilizarse para separar la señal del fondo.

En el capítulo 2 se desarrolla la parte teórica del problema del acople entre dos partículas en dos partes: una primera simple -dipolar- que tiene solución analítica y luego una más compleja -multipolar- que debe ser resuelta numéricamente. La primera no sólo permite una comprensión conceptual de la técnica, sino que brinda un punto de partida para ajustar por iteración los datos experimentales con la solución multipolar.

En el capítulo 3 se describe el dispositivo experimental que consta de un microscopio con iluminación por reflexión total interna modificado para poder variar la polarización e incidir con dos diferentes longitudes de onda. Se exponen las calibraciones realizadas y la puesta a punto del sistema.

---

<sup>1</sup> Reinhard 2005, Sonnichsen 2005

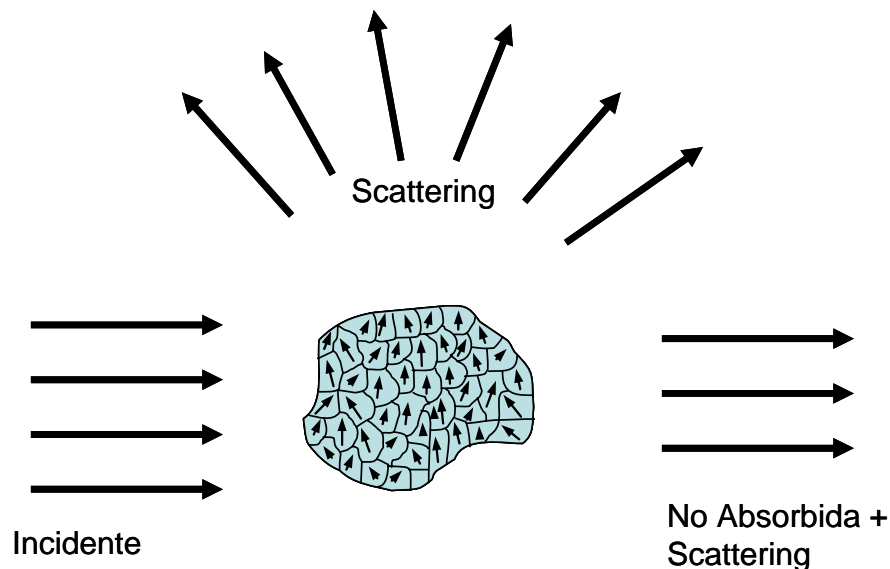
En el capítulo 4 se muestran los resultados experimentales y se discute la forma en la que se realizó el análisis y ajuste de datos para llegar de las imágenes a la caracterización de los dímeros.

Finalmente, en el capítulo 5 se dan las conclusiones de la tesis destacando aquellos aspectos innovadores y se proponen diversas líneas para mejorar la técnica.

*En éste capítulo se discute la teoría vinculada con el fenómeno de acoplamiento electromagnético entre partículas metálicas. En primer lugar se realiza una breve reseña de Scattering. Luego se presenta el problema de dos esferas muy próximas y se lo resuelve usando primero la aproximación dipolar y luego un método multipolar.*

## 2. Scattering de partículas metálicas

Al iluminar una partícula, no toda la energía la atraviesa incólume. Mientras que una parte es dispersada (desviada de su dirección original), otra es absorbida. Puede estudiarse conceptualmente este problema dividiendo la partícula en elementos de volumen infinitesimales (**Figura 2-1**) en los que se inducen un momento dipolar debido a la presencia del campo incidente. Estos dipolos inducidos oscilan a la frecuencia del mismo y radian en todas las direcciones, afectando a los elementos de volumen vecinos.



**Figura 2-1. Presentación del problema de Scattering.** Una onda plana incide sobre una partícula, parte de la energía se dispersa, parte se absorbe y parte la atraviesa. La partícula se toma como un conjunto de dipolos donde cada uno toma un valor acorde con el campo en ese punto, que es la suma del campo incidente y los campos de los otros dipolos

Entonces la polarización del elemento  $i$  se relacionará con la del elemento  $j$  a través de sus campos con la siguiente relación:

$$\vec{p}_i = \varepsilon_m \alpha_v \sum_{j \neq i} \vec{E}_{j \rightarrow i}(\vec{p}_j) \quad (2.1)$$

donde  $\alpha_v$  es la polarizabilidad del elemento de volumen y  $\varepsilon_m$  es la constante dieléctrica del medio.

Esta idea puede extenderse al estudio de un arreglo de partículas dividiendo cada una de ellas en volúmenes infinitesimales y calculando el efecto que tiene cada dipolo inducido sobre todos los otros (sean de la misma partícula o de otras). El subíndice  $j$  de la ecuación (2.1) recorrerá ahora los elementos de volumen de todas las partículas. Es claro que a causa de este acople el campo de Scattering de un arreglo de partículas no será simplemente la suma de las contribuciones de las partículas tratadas en forma aislada.

Una vez obtenido el campo electromagnético dentro y fuera de las partículas puede calcularse el vector de Poynting en cualquier punto del espacio y obtener así el flujo de energía. Para su uso en microscopía de campo lejano sólo debe considerarse las componentes radiativas de los campos de las partículas,<sup>1</sup> que pueden agruparse en un único término  $\vec{E}_{sca}$  ( $\vec{H}_{sca}$ ). El campo fuera de las partículas será entonces la suma del incidente y  $\vec{E}_{sca}$  ( $\vec{H}_{sca}$ )

$$\begin{aligned} \vec{E}_{fuera} &= \vec{E}_{inc} + \vec{E}_{sca} \\ \vec{H}_{fuera} &= \vec{H}_{inc} + \vec{H}_{sca} \end{aligned} \quad (2.2)$$

Para calcular el flujo de energía en campo lejano, escribiremos primero el promedio temporal del vector de Poynting como la suma de tres términos<sup>2</sup> (incidente, Scattering, extinción):

---

<sup>1</sup> Es importante recalcar que los efectos del campo cercano (ondas evanescentes) sobre los otros elementos de volumen y sobre las otras partículas son relevantes para calcular el acople, y son tenidos en cuenta al resolver el sistema (2.1).

<sup>2</sup> Bohren 1983 Sección 3.3 ss.

$$\begin{aligned}
\vec{S} &= \frac{1}{2} \text{Re} \{ \vec{E}_{fuera} \times \vec{H}_{fuera}^* \} \\
\vec{S} &= \frac{1}{2} \text{Re} \{ (\vec{E}_{inc} + \vec{E}_{sca}) \times (\vec{H}_{inc} + \vec{H}_{sca})^* \} \\
\vec{S} &= \vec{S}_{inc} + \vec{S}_{sca} + \vec{S}_{ext}
\end{aligned} \tag{2.3}$$

con

$$\begin{aligned}
\vec{S}_{inc} &= \frac{1}{2} \text{Re} \{ \vec{E}_{inc} \times \vec{H}_{inc}^* \} \\
\vec{S}_{sca} &= \frac{1}{2} \text{Re} \{ \vec{E}_{sca} \times \vec{H}_{sca}^* \} \\
\vec{S}_{ext} &= \frac{1}{2} \text{Re} \{ \vec{E}_{inc} \times \vec{H}_{sca}^* + \vec{E}_{sca} \times \vec{H}_{inc}^* \}
\end{aligned} \tag{2.4}$$

La energía absorbida por el medio y las partículas será el flujo entrante del vector de Poynting<sup>1</sup>:

$$\begin{aligned}
W_{abs} &= - \int_{\Omega} \vec{S} \cdot \hat{e}_r r^2 d\Omega = - \int_{\Omega} (\vec{S}_{inc} + \vec{S}_{sca} + \vec{S}_{ext}) \cdot \hat{e}_r r^2 d\Omega = \\
&= W_{inc} - W_{sca} + W_{ext}
\end{aligned} \tag{2.5}$$

Si se supone al medio como no absorbente,  $W_{abs}$  representa sólo la energía absorbida por las partículas y  $W_{inc}$  es idénticamente nulo ya que la onda no se atenúa. Queda así definida  $W_{ext}$  como la suma de las tasas de absorción y Scattering de la energía

$$W_{ext} = W_{abs} + W_{sca} \tag{2.6}$$

Para la mayoría de las aplicaciones es útil definir la sección eficaz como el cociente entre el flujo de energía y la intensidad incidente  $C = W/I_{inc}$ . Para una onda plana con amplitud del campo eléctrico  $E_{inc}$  se calcula

$$I_{inc} = \frac{1}{2} \text{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\epsilon_m}{\mu_m}} \right\} |E_{inc}|^2 \tag{2.7}$$

Se puede escribir una relación análoga a la (2.6) para las secciones eficaces

$$C_{ext} = C_{abs} + C_{sca} \tag{2.8}$$

---

<sup>1</sup>  $W_{sca}$  se define con el signo cambiado para que quede positivo ya que el flujo de Scattering es siempre saliente

## 2.1. Aproximación Dipolar

Cuando la partícula es esférica y pequeña comparada con la longitud de onda del haz incidente resulta una buena aproximación poner un único dipolo en el centro de la misma. El momento dipolar inducido por la presencia de un campo electromagnético será

$$\vec{p} = \varepsilon_m \alpha \vec{E} \quad (2.9)$$

siendo  $\alpha$  la polarizabilidad de la partícula y  $\varepsilon_m$  la constante dieléctrica del medio circundante.  $\alpha$  puede ser escrita en términos de sus propiedades

$$\alpha = 4\pi a^3 \frac{\varepsilon_{np} - \varepsilon_m}{\varepsilon_{np} + 2\varepsilon_m} \quad (2.10)$$

con  $a$  el radio de la partícula y  $\varepsilon_{np}$  su constante dieléctrica.

El potencial generado por este dipolo será<sup>1</sup>

$$V_{dip} = \frac{1}{4\pi\varepsilon_m} \frac{\vec{p}\vec{r}}{r^3} \quad (2.11)$$

de donde se obtiene el campo como

$$\vec{E}_{dip} = -\vec{\nabla}(V_{dip}) \quad (2.12)$$

En campo lejano, el campo de un dipolo está dado por:

$$\begin{aligned} \vec{E}_{sca} &= \frac{1}{4\pi\varepsilon_m} k^2 \frac{e^{ikr}}{r} (\hat{n} \times \vec{p}) \times \hat{n} \\ \vec{H}_{sca} &= \sqrt{\frac{\varepsilon_m}{\mu_m}} \hat{n} \times \vec{E}_{sca} = \sqrt{\frac{\varepsilon_m}{\mu_m}} \frac{1}{4\pi\varepsilon_m} k^2 \frac{e^{ikr}}{r} (\hat{n} \times \vec{p}) \end{aligned} \quad (2.13)$$

donde  $\hat{n}$  es la dirección de observación y  $\mu_m$  la permitividad del medio.

Con las expresiones para los campos se puede calcular la sección eficaz de Scattering para una partícula pequeña ( $a \ll \lambda$ )

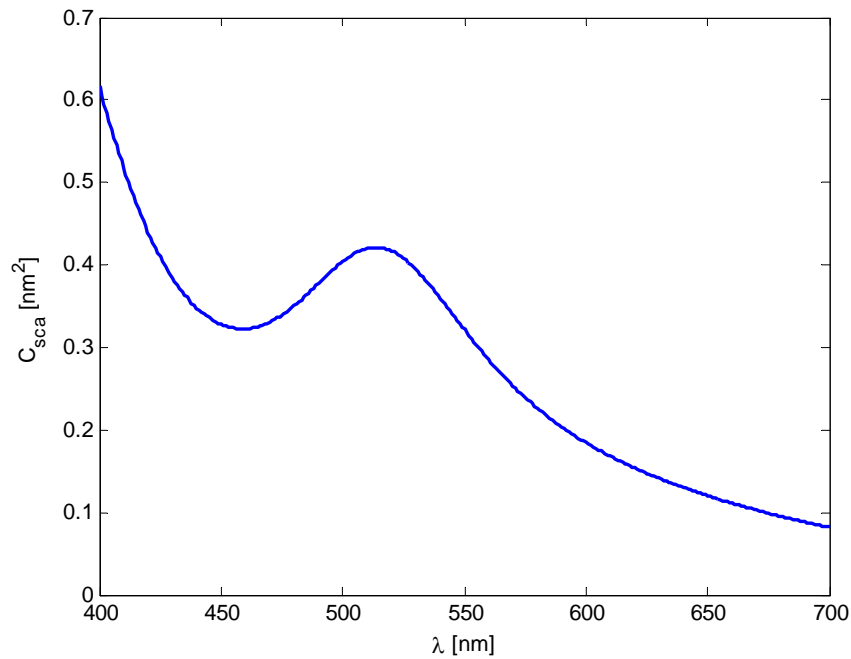
---

<sup>1</sup> Jackson 1998 pp. 410ss



$$\begin{aligned}
C_{sca} &= \frac{1}{I_{inc} |\varepsilon_m|^2 (4\pi)^2} k^4 \frac{1}{2} \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_m}{\mu_m}} \right\} \int_{\Omega} |\vec{p} - \hat{e}_r (\vec{p}^* \cdot \hat{e}_r)|^2 d\Omega \\
&= \frac{1}{|\varepsilon_m|^2 (4\pi)^2} k^4 \frac{8}{3} \pi |\varepsilon_m \alpha|^2 \\
&= k^4 \frac{8}{3} \pi a^6 \left| \frac{\varepsilon_{np} - \varepsilon_m}{\varepsilon_{np} + 2\varepsilon_m} \right|^2
\end{aligned} \tag{2.14}$$

En la **Figura 2-2** se muestra la sección eficaz de Scattering en función de la longitud de onda para una partícula de oro de 20 nm de diámetro en vacío. Los valores de la constante dieléctrica se interpolan de los disponibles en la literatura.<sup>1</sup> Además del decaimiento con la longitud de onda propio del Scattering de Rayleigh, se observa la resonancia del plasmón mencionada en el capítulo anterior

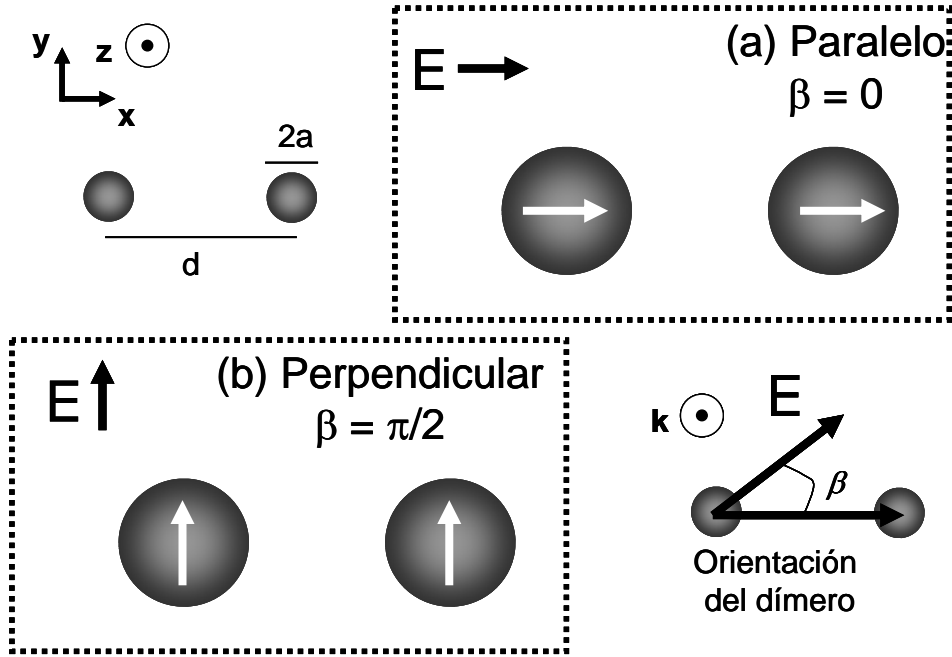


**Figura 2-2. Espectro de una nanopartícula de oro.** Para una partícula de oro de 20 nm de diámetro se grafica la sección eficaz de Scattering en función de la longitud de onda incidente. Se observa un pico correspondiente a la resonancia del plasmón (oscilaciones colectivas de los electrones). Para un mismo material, la posición y el ancho del pico dependen del tamaño de la partícula.

<sup>1</sup> Bass 1995 Cap. 35

## 2.2. Aproximación dipolar para partículas acopladas

Supongamos ahora dos partículas metálicas idénticas de radio  $a$ , ubicadas a distancia  $d$  sobre el eje  $x$  ( $r_1 = -\frac{d}{2}\hat{x}, r_2 = \frac{d}{2}\hat{x}$ ) (**Figura 2-3**) y una onda plana incidente ( $\vec{E}_{inc}$ ) de longitud de onda  $\lambda$  (tal que  $\lambda \gg d$ ), que se propaga en la dirección  $z$  y puede estar polarizada en  $x$  (caso paralelo) o en  $y$  (caso perpendicular) ( $\vec{E}_{par} = E_{inc}\hat{x}, \vec{E}_{per} = E_{inc}\hat{y}$ ).



**Figura 2-3. Aproximación dipolar del dímero.** Dos partículas de radio  $a$  ubicadas sobre el eje  $x$  a distancia  $d$ . Una onda plana de longitud de  $\lambda$  incide sobre el dímero polarizada en  $x$  (caso paralelo) o en  $y$  (caso perpendicular). Cada partícula se aproxima por un dipolo ubicado en su centro. Para una polarización arbitraria se denomina  $\beta$  al ángulo entre ésta y la dirección del dímero.

Si el radio comparado con la distancia entre las partículas es tal que, a los efectos de evaluar el campo que una ejerce sobre la otra, se las puede considerar puntuales, las ecuaciones a resolver son

$$\begin{aligned}\vec{p}_1 &= \varepsilon_m \alpha (\vec{E}_{inc} + \vec{E}_{2 \rightarrow 1}) \\ \vec{p}_2 &= \varepsilon_m \alpha (\vec{E}_{inc} + \vec{E}_{1 \rightarrow 2})\end{aligned}\quad (2.15)$$

donde  $\vec{E}_{2 \rightarrow 1}$  y  $\vec{E}_{1 \rightarrow 2}$  representan respectivamente el campo eléctrico generado por 2 sobre el centro de la partícula 1 y el generado por 1 sobre el centro de 2.

Con esta expresión y las posiciones de las partículas puede resolverse el sistema de ecuaciones (2.15) obteniéndose para el caso paralelo que:

$$\begin{aligned}\vec{p}_1 = \vec{p}_2 &= f_{par} \varepsilon_m \alpha E_{inc} \hat{x} \\ f_{par} &= \frac{1}{1 - \frac{\alpha}{2d^3 \pi}}\end{aligned}\quad (2.16)$$

y para el caso perpendicular a

$$\begin{aligned}\vec{p}_1 = \vec{p}_2 &= f_{per} \varepsilon_m \alpha E_{inc} \hat{y} \\ f_{per} &= \frac{2}{2 + \frac{\alpha}{2d^3 \pi}}\end{aligned}\quad (2.17)$$

El resultado es el mismo que se obtendría si se despreciara la interacción entre las partículas ( $\varepsilon_m \alpha E_{inc}$ ) pero multiplicado por un factor adimensional. Teniendo en cuenta que de (2.10) se ve que  $\alpha$  depende del radio al cubo, es interesante notar que la única dependencia geométrica en la expresión es como el cociente entre el radio de las partículas y la distancia entre ellas. Se puede realizar un paralelismo con el fenómeno de FRET descrito en la introducción, en el cual el rango de interacción está dado por  $R_0$ , una magnitud dependiente del par aceptor-donor nunca superior a los 10 nm. En Scattering, es el diámetro de la nanopartícula, disponible desde unos pocos hasta decenas de nanómetros, el que determina la distancia máxima de acople. Este hecho permite una técnica intrínseca de medición de separaciones con un rango mucho mayor a FRET.

Para un dímero, la sección eficaz de Scattering estará dada por

$$\begin{aligned}C_{sca} &= \frac{1}{2I_{inc}} \operatorname{Re} \left\{ \int_{\Omega} \left[ (\bar{E}_1 + \bar{E}_2) \times (\bar{H}_1 + \bar{H}_2)^* \right] \cdot \hat{e}_r r^2 d\Omega \right\} \\ &= \frac{1}{2I_{inc}} \operatorname{Re} \left\{ \int_{\Omega} (\bar{E}_1 \times \bar{H}_1^* + \bar{E}_2 \times \bar{H}_2^* + \bar{E}_1 \times \bar{H}_2^* + \bar{E}_2 \times \bar{H}_1^*) \cdot \hat{e}_r r^2 d\Omega \right\}\end{aligned}\quad (2.18)$$

Usando (2.13) en (2.18) y simplificando, se obtiene

$$C_{sca} = \frac{1}{2I_{inc}} \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_m}{\mu_m}} \frac{1}{(4\pi)^2 |\varepsilon_m|^2} k^4 \int_{\Omega} \left| \sum_{j=1}^2 [\vec{p}_j - \hat{n}_j (\vec{p}_j \cdot \hat{n}_j)] \cdot e^{-ik\hat{n}_j r_j} \right|^2 d\Omega \right\} \quad (2.19)$$

Teniendo en cuenta que ambos dipolos tienen la misma orientación y valor ( $pE_{inc}\hat{p}$ , siendo  $p$  el módulo del momento dipolar por unidad de campo) y que a distancias muy grandes  $\vec{n}_1 \approx \vec{n}_2 \approx \hat{e}_r$ , se llega a que

$$C_{sca} = \frac{1}{(4\pi)^2 |\epsilon_m|^2} k^4 pp^* \int_{\Omega} \left(1 - (\hat{p}\hat{e}_r)^2\right) \left| \sum_{j=1}^2 e^{-ik\hat{e}_r \cdot \hat{r}_j} \right|^2 d\Omega \quad (2.20)$$

Reemplazando las posiciones de las partículas y simplificando

$$C_{sca} = \frac{1}{(4\pi)^2 |\epsilon_m|^2} k^4 pp^* 2 \int_{\Omega} \left(1 - (\hat{p}\hat{e}_r)^2\right) (1 + \cos(kd \cdot \hat{x}\hat{e}_r)) d\Omega \quad (2.21)$$

La integral puede ser resuelta exactamente y se llega a

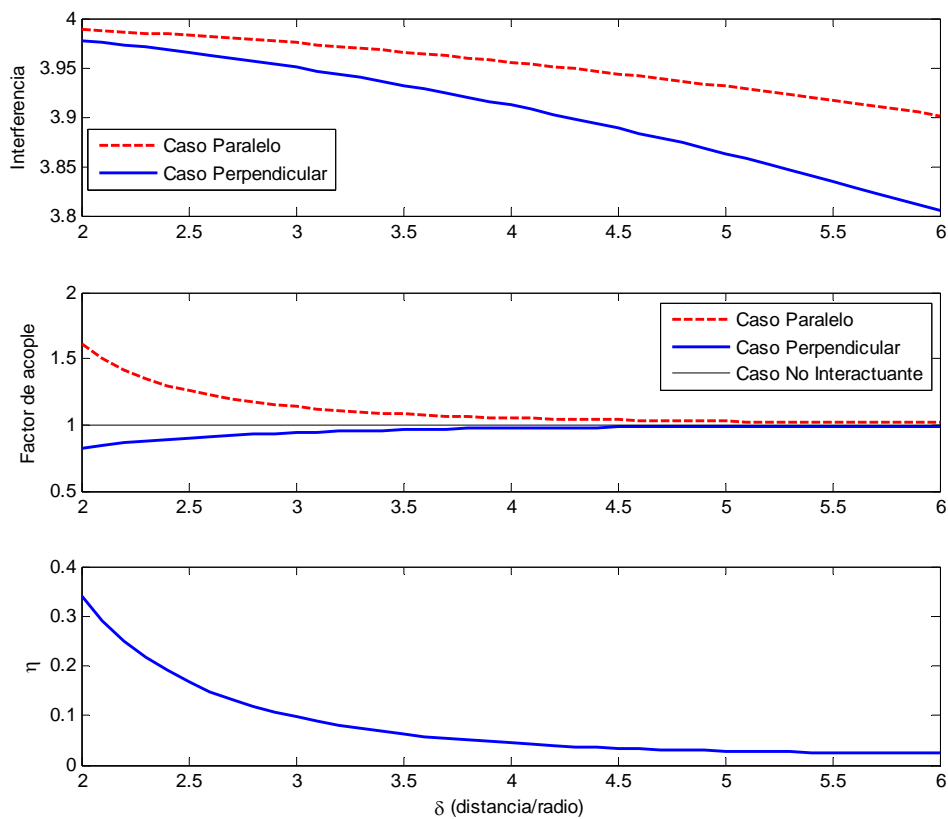
$$\begin{aligned} C_{sca,par} &= \frac{1}{(4\pi)^2 |\epsilon_m|^2} k^4 P_{par} P_{par}^* 2 \left[ 1 + 3 \left( \frac{\text{sen}(kd)}{(kd)^3} - \frac{\text{cos}(kd)}{(kd)^2} \right) \right] \\ C_{sca,per} &= \frac{1}{(4\pi)^2 |\epsilon_m|^2} k^4 P_{per} P_{per}^* 2 \left[ 1 + \frac{3}{2} \left( \frac{\text{sen}(kd)}{(kd)} + \frac{\text{cos}(kd)}{(kd)^2} - \frac{\text{sen}(kd)}{(kd)^3} \right) \right] \end{aligned} \quad (2.22)$$

Es conveniente para la discusión normalizar este valor dividiendo por el que se obtendría de calcularse la sección eficaz de Scattering una partícula aislada e idéntica a las que componen el dímero calculada en (2.14).

$$\begin{aligned} K_{par} &= \frac{C_{dímero}}{C_{monomero}} = |f_{par}|^2 2 \left[ 1 + 3 \left( \frac{\text{sen}(kd)}{(kd)^3} - \frac{\text{cos}(kd)}{(kd)^2} \right) \right] \\ K_{per} &= \frac{C_{dímero}}{C_{monomero}} = |f_{per}|^2 2 \left[ 1 + \frac{3}{2} \left( \frac{\text{sen}(kd)}{(kd)} + \frac{\text{cos}(kd)}{(kd)^2} - \frac{\text{sen}(kd)}{(kd)^3} \right) \right] \end{aligned} \quad (2.23)$$

donde por simplicidad con  $C$  se abrevia  $C_{sca}$ . La sección eficaz queda como el producto de dos términos: uno correspondiente al acople ( $f$ ) y otro a la interferencia.

Insertando (2.16) y (2.17) en (2.23) podemos obtener las secciones eficaces normalizadas para los casos paralelo y perpendicular, y en particular el cociente entre ambas en función del parámetro adimensional  $\eta$  definida como la distancia/radio. Las curvas para una onda plana linealmente polarizada ( $\lambda = 532\text{nm}$ ) incidiendo sobre un dímero compuestas por nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro se muestran en la **Figura 2-4**



**Figura 2-4. Término Interferométrico (TI), factor de acople ( $f$ ) y anisotropía ( $\eta$ ) en función de la distancia.** Aproximación dipolar. El dímero está compuesto por partículas de oro de 20 nm de diámetro y se incide con una onda plana linealmente polarizada cuya longitud de onda es 532 nm. La distancia se encuentra normalizada por el radio de las partículas. (arriba)  $TI$  Se observa que disminuye de 4 (interferencia constructiva) a 2 (no se muestra) y que para las distancias involucradas no sufren un cambio significativo. (medio)  $f$  Cuando la polarización incidente es paralela al eje del dímero, los campos de cada una de las partículas refuerzan el campo externo sobre la otra resultando en un valor superior al caso no interactuante ( $f=1$ ). Para el caso perpendicular la interacción mutua se opone al campo incidente. (abajo)  $\eta$  De un valor máximo que depende del sistema estudiado, disminuye a cero a medida que la interacción se vuelve despreciable.

Es interesante remarcar algunos aspectos de este resultado. El término interferométrico decrece de 4 en  $d=0$  (interferencia constructiva en toda la esfera de integración), a 2 cuando  $kd \gg \lambda$  (zonas de interferencia constructiva y destructiva que se promedian). Cuando la partícula es muy pequeña respecto de la longitud de onda, para las distancias de interés el término interferométrico varía menos de un 10% siendo el acople el principal factor de anisotropía.

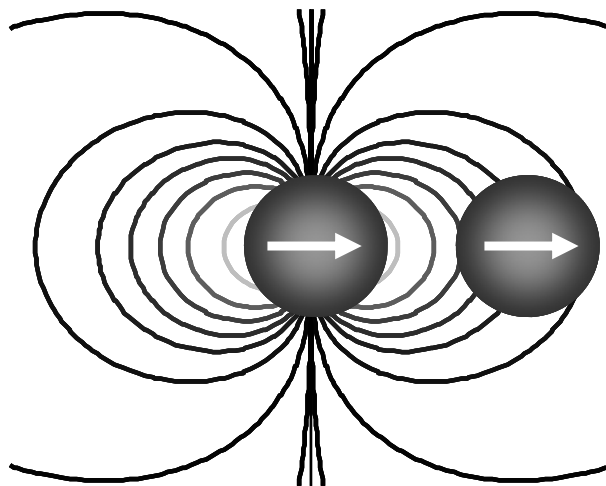
Como fuera mencionado al final de la introducción, el acople  $f$  es mayor en el caso paralelo que en el perpendicular. Este hecho que se puede explicar por la acción del campo de un dipolo sobre el otro, que en un caso refuerza y en el otro

debilita la acción del campo incidente. Por este mismo motivo, el valor que se obtiene en el caso paralelo (perpendicular) es mayor (menor) al que se obtiene en el caso de dos partículas no interactuantes ( $f_{noi} = 1$ ).

Se puede definir la anisotropía ( $\eta$ ) como

$$\eta = \frac{C_{\max} - C_{\min}}{C_{\max} + C_{\min}} = \frac{C_{par} - C_{per}}{C_{par} + C_{per}} \quad (2.24)$$

Por definición la anisotropía tendrá valor mínimo 0 (caso totalmente isótropo) y 1 como máximo (totalmente anisótropo). Sin embargo el máximo valor alcanzable dependerá de la disposición geométrica y las propiedades ópticas del sistema físico. En el caso que se muestra en la **Figura 2-4** se alcanza un valor máximo de 0,6 cuando las partículas se tocan.



**Figura 2-5. Insuficiencia de la aproximación dipolar.** Se muestran las curvas de isopotencial de una de las partículas. La aproximación dipolar es insuficiente cuando la distancia entre las partículas es tal que la variación del campo electromagnético de una partícula sobre el volumen de la otra no es despreciable.

Si la distancia entre partículas es tal, que el campo de una partícula varía significativamente sobre el volumen de la otra, la aproximación dipolar no es suficiente para describir correctamente el problema. En la **Figura 2-5** se observa una representación de las partículas con las curvas del potencial dipolar de una de ellas. Los elementos de volumen de una partícula que se encuentran más cerca de la otra están bajo la acción de un campo mayor que los más alejados. Para calcular

correctamente el acople es preciso incorporar términos multipolares que den cuenta de la extensión de las partículas.

### 2.3. Scattering de Mie

En 1908, Gustav Mie resolvió el problema de una partícula esférica en presencia de un campo electromagnético incidente en un esfuerzo por entender las propiedades espectrales de partículas de oro coloidales suspendidas en agua. Si bien la teoría de Mie está limitada a partículas aisladas o débilmente interactuantes presenta la base para la formulación que se expondrá en la siguiente sección.

El problema electromagnético está completamente determinado por las ecuaciones de Maxwell y las condiciones de contorno. En un espacio libre de fuentes y asumiendo una dependencia temporal como  $e^{-i\omega t}$

$$\begin{aligned}\nabla \cdot \vec{E} &= 0 & \nabla \cdot \vec{H} &= 0 \\ \nabla \times \vec{E} &= i\omega\mu\vec{H} & \nabla \times \vec{H} &= -i\omega\varepsilon\vec{E}\end{aligned}\quad (2.25)$$

con  $k^2 = \omega^2 \varepsilon\mu$ . De donde se obtienen las ecuaciones de onda para  $\vec{E}$  y  $\vec{H}$

$$\begin{aligned}(\nabla^2 + k^2)\vec{E} &= 0 \\ (\nabla^2 + k^2)\vec{H} &= 0\end{aligned}\quad (2.26)$$

Dado  $\vec{c}$  un vector constante y  $\psi$  una función escalar podemos construir dos campos vectoriales como

$$\begin{aligned}\vec{M} &= \nabla \times (\vec{c}\psi) \\ \vec{N} &= \frac{\nabla \times \nabla \times (\vec{c}\psi)}{k}\end{aligned}\quad (2.27)$$

que como derivan de un rotor tienen divergencia nula. Usando identidades vectoriales podemos llegar a

$$\nabla^2 \vec{M} + k^2 \vec{M} = \nabla \times [\vec{c}(\nabla^2 \psi + k^2 \psi)]\quad (2.28)$$

Cuando  $\psi$  es solución de la ecuación de onda escalar,  $\vec{M}$  y  $\vec{N}$  satisfacen las condiciones impuestas en (2.25) y (2.26) a los campos electromagnéticos sin fuentes. El problema de encontrar las soluciones  $\vec{M}$  y  $\vec{N}$  se reduce entonces al problema más simple de encontrar las soluciones para  $\psi$ .

La elección del vector  $\vec{c}$  y la función  $\psi$  debe ser acorde con la simetría del problema. Al buscar las soluciones del campo electromagnético para una esfera, se propone  $\psi$  tal que satisfaga la ecuación de onda en coordenadas esféricas  $(r, \theta, \phi)$ .

Se elije  $\vec{c} = \vec{r}$  para que  $\vec{M}$  sea solución de la ecuación de ondas vectoriales en coordenadas esféricas.

Buscando soluciones que cumplan lo anteriormente mencionado, la separación de variables y que sean univaluadas se llega a

$$\psi_{mn}^{(t)}(r, \theta, \phi) = P_n^m(\cos(\theta)) z_n^{(t)}(kr) e^{im\phi} \quad (2.29)$$

donde  $m$  y  $n$  son enteros,  $P_n^m$  son los polinomios asociados de Legendre y  $z_n^{(t)}$  es la función esférica de Bessel<sup>1</sup> adecuada para satisfacer las condiciones de contorno. Por la completitud de las funciones que la componen,  $\psi$  forma una base en la cual puede ser expandida cualquier función que satisfaga la ecuación de ondas escalar. Por los mismo argumentos, cualquier campo electromagnético podrá ser expandido en una serie infinita de  $\vec{M}$  y  $\vec{N}$ , llamados armónicos esféricos vectoriales (AEV).

El campo incidente se expande según

$$\begin{aligned} \vec{E}_{inc} &= -i \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n E_{mn} \left( p_{mn} \vec{N}_{mn}^{(1)} + q_{mn} \vec{M}_{mn}^{(1)} \right) \\ \vec{H}_{inc} &= \frac{-k}{\omega\mu} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n E_{mn} \left( q_{mn} \vec{N}_{mn}^{(1)} + p_{mn} \vec{M}_{mn}^{(1)} \right) \\ E_{mn} &= |E_o| i^n (2n+1) \frac{(n-m)!}{(n+m)!} \end{aligned} \quad (2.30)$$

Para el campo interno se elige la función de Bessel de primer tipo ya que no diverge en el origen

$$\begin{aligned} \vec{E}_{int} &= -i \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n E_{mn} \left( d_{mn} \vec{N}_{mn}^{(1)} + c_{mn} \vec{M}_{mn}^{(1)} \right) \\ \vec{H}_{int} &= \frac{-k}{\omega\mu} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n E_{mn} \left( c_{mn} \vec{N}_{mn}^{(1)} + d_{mn} \vec{M}_{mn}^{(1)} \right) \end{aligned} \quad (2.31)$$

Para el campo de Scattering se utiliza la función de Hankel de primer tipo ( $t=3$ ) que tiende a cero en el infinito y es una onda divergente.<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Las funciones esféricas de Bessel  $z_n^{(t)}$  se definen como  $z_n^{(t)}(\rho) = \sqrt{\frac{\pi}{2\rho}} Z_n^{(t)}(\rho)$ , con  $Z_n^{(t)}$  las

funciones de Bessel convencionales ( $t$  de 1 a 4 correspondiente a Bessel de primer tipo, Bessel de segundo tipo, Hankel de primer tipo, Hankel de segundo tipo)

<sup>2</sup> Bohren 1983 pp. 94



$$\begin{aligned}\vec{E}_{sca} &= i \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n E_{mn} \left( a_{mn} \vec{N}_{mn}^{(3)} + b_{mn} \vec{M}_{mn}^{(3)} \right) \\ \vec{H}_{sca} &= \frac{k}{\omega\mu} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n E_{mn} \left( b_{mn} \vec{N}_{mn}^{(3)} + a_{mn} \vec{M}_{mn}^{(3)} \right)\end{aligned}\quad (2.32)$$

En el caso de una onda plana con su vector de propagación dado por la expresión  $\vec{k} = 2\pi/\lambda (\hat{e}_x \sin \alpha \cos \beta + \hat{e}_y \sin \alpha \sin \beta + \hat{e}_z \cos \alpha)$ , para el caso TM y en las coordenadas de una partícula ubicada en  $\vec{r}$ , los coeficientes son de la forma<sup>1</sup>:

$$\begin{aligned}p_{mn} &= e^{i\vec{k}\vec{r}} \frac{1}{n(n+1)} \tau_{mn}(\cos \alpha) e^{-im\beta} \\ q_{mn} &= e^{i\vec{k}\vec{r}} \frac{1}{n(n+1)} \pi_{mn}(\cos \alpha) e^{-im\beta}\end{aligned}\quad (2.33)$$

Para un caso restringido en el cual la partícula se encuentra en el origen y el campo incidente es una onda plana polarizada en  $x$  y que se propaga según  $z$ , la expansión<sup>2</sup> está dada únicamente por los términos con  $m=1$  y  $-1$

$$\begin{aligned}p_{1n} &= \frac{1}{2} = q_{1n} \\ p_{-1,n} &= -\frac{1}{2n(n+1)} = -q_{-1,n}\end{aligned}\quad (2.34)$$

Teniendo en cuenta las relaciones existentes entre los AEV y sus conjugados, puede reducirse la expansión a los términos con  $m=1$ .

$$\begin{aligned}\vec{E}_{inc} &= -i \sum_{n=1}^{\infty} E_{1n} \left( \text{Re}[\vec{N}_{1n}^{(1)}] + i \text{Im}[\vec{M}_{1n}^{(1)}] \right) \\ \vec{H}_{inc} &= \frac{-k}{\omega\mu} \sum_{n=1}^{\infty} E_{1n} \left( i \text{Im}[\vec{N}_{1n}^{(1)}] + \text{Re}[\vec{M}_{1n}^{(1)}] \right)\end{aligned}\quad (2.35)$$

Al incidir en una esfera, sobre la superficie de la misma deben satisfacerse las condiciones de contorno los campos incidentes (*inc*), de Scattering (*sca*) e interno (*int*).

---

<sup>1</sup> Las funciones  $\tau_{mn}$  y  $\pi_{mn}$  se definen a partir de los polinomios asociados de Legendre según

$$\pi_{mn}(\cos \theta) = \frac{m}{\sin \theta} P_n^m(\cos \theta), \tau_{mn}(\cos \theta) = \frac{d}{d\theta} P_n^m(\cos \theta)$$

<sup>2</sup> Bohren 1983 pp. 89

$$\begin{aligned}(\vec{E}_{inc} + \vec{E}_{sca} - \vec{E}_{int}) \times \hat{e}_r &= 0 \\ (\vec{H}_{inc} + \vec{H}_{sca} - \vec{H}_{int}) \times \hat{e}_r &= 0\end{aligned}\quad (2.36)$$

De las componentes tangenciales a  $\hat{e}_r$  quedan definidos cuatro grupos de ecuaciones ( $E_{\theta, mn}$ ,  $E_{\phi, mn}$ ,  $H_{\theta, mn}$ ,  $H_{\phi, mn}$ ) para cuatro grupos de incógnitas ( $a_{mn}$ ,  $b_{mn}$ ,  $c_{mn}$ ,  $d_{mn}$ ). De forma similar a (2.35), (2.36), los campos de internos y de Scattering pueden expandirse también en una suma de armónicos esféricos vectoriales y por su ortogonalidad se ve que los únicos coeficientes no nulos será aquellos con  $m=1$ .

$$\begin{aligned}\vec{E}_{int} &= -i \sum_{n=1}^{\infty} E_{1n} \left( d_n \operatorname{Re}[\vec{N}_{1n}^{(1)}] + ic_n \operatorname{Im}[\vec{M}_{1n}^{(1)}] \right) \\ \vec{H}_{int} &= \frac{-k}{\omega\mu} \sum_{n=1}^{\infty} E_{1n} \left( ic_n \operatorname{Im}[\vec{N}_{1n}^{(1)}] + d_n \operatorname{Re}[\vec{M}_{1n}^{(1)}] \right)\end{aligned}\quad (2.37)$$

$$\begin{aligned}\vec{E}_{sca} &= i \sum_{n=1}^{\infty} E_{1n} \left( a_n \operatorname{Re}[\vec{N}_{1n}^{(1)}] + ib_n \operatorname{Im}[\vec{M}_{1n}^{(1)}] \right) \\ \vec{H}_{sca} &= \frac{k}{\omega\mu} \sum_{n=1}^{\infty} E_{1n} \left( ib_n \operatorname{Im}[\vec{N}_{1n}^{(1)}] + a_n \operatorname{Re}[\vec{M}_{1n}^{(1)}] \right)\end{aligned}\quad (2.38)$$

donde  $a_n = 2 a_{1n}$ , y lo mismo para  $b$ ,  $c$  y  $d$ . Usando la expansión de los campos en la ecuación de borde para una partícula de radio  $a$  pueden encontrarse la expresiones para los coeficientes de expansión:

$$\begin{aligned}a_n &= \frac{\tilde{n} \psi_n(\tilde{n}x) \psi_n'(x) - \psi_n(x) \psi_n'(\tilde{n}x)}{\tilde{n} \mu_m \mu_{np}^{-1} \psi_n(\tilde{n}x) \xi_n'(x) - \xi_n(x) \psi_n'(\tilde{n}x)} \\ b_n &= \frac{\psi_n(\tilde{n}x) \psi_n'(x) - \tilde{n} \psi_n(x) \psi_n'(\tilde{n}x)}{\psi_n(\tilde{n}x) \xi_n'(x) - \tilde{n} \mu_m \mu_{np}^{-1} \xi_n(x) \psi_n'(\tilde{n}x)} \\ c_n &= \frac{\psi_n(x) \xi_n'(x) - \xi_n(x) \psi_n'(x)}{\psi_n(\tilde{n}x) \xi_n'(x) - \tilde{n} \mu_m \mu_{np}^{-1} \xi_n(x) \psi_n'(\tilde{n}x)} \\ d_n &= \frac{\psi_n(x) \xi_n'(x) - \xi_n(x) \psi_n'(x)}{\tilde{n} \mu_m \mu_{np}^{-1} \psi_n(\tilde{n}x) \xi_n'(x) - \xi_n(x) \psi_n'(\tilde{n}x)}\end{aligned}\quad (2.39)$$

donde  $\psi$  y  $\xi$  son las funciones de Riccati-Bessel,<sup>1</sup>  $\tilde{n}$  es el índice de refracción de la partícula respecto del índice del medio ( $n_{np}/n_m$ ) y  $x$  el producto del vector de onda en el medio y el radio de la partícula ( $ka$ ).

---

<sup>1</sup>  $\psi_n(\rho) = \rho z_n^{(1)}(\rho)$  y  $\xi_n(\rho) = \rho z_n^{(3)}(\rho)$

Recordando la definición de las secciones eficaces se llega a que

$$\begin{aligned} C_{sca} &= \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) (|a_n|^2 + |b_n|^2) \\ C_{ext} &= \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \operatorname{Re}(a_n + b_n) \end{aligned} \quad (2.40)$$

Es conveniente para la próxima sección encontrar la expresión de los coeficientes de expansión para un campo incidente arbitrario. Es decir hallar la solución de (2.36) usando (2.30) cualquiera sea  $p$  y  $q$ . Los cuatro grupos de ecuaciones mencionados son

$$\begin{aligned} E_{inc,\theta} + E_{sca,\theta} &= E_{int,\theta} \\ H_{inc,\theta} + H_{sca,\theta} &= H_{int,\theta} \\ E_{inc,\phi} + E_{sca,\phi} &= E_{int,\phi} \\ H_{inc,\phi} + H_{sca,\phi} &= H_{int,\phi} \end{aligned} \quad (2.41)$$

con las funciones evaluadas en la superficie de la esfera ( $r=a$ ).

Usando la ortogonalidad de  $e^{im\phi}$ , los desarrollos de los campos y la expresión de los AEV se llega a cuatro ecuaciones lineales para los coeficientes

$$\begin{aligned} z_n^{(1)}(\tilde{n}x)c_{mn} + z_n^{(3)}(x)b_{mn} &= q_{mn}z_n^{(1)}(x) \\ \mu_m \left[ \tilde{n}xz_n^{(1)}(\tilde{n}x) \right]' c_{mn} + \mu_{np} \left[ xz_n^{(3)}(x) \right]' b_{mn} &= q_{mn}\mu_{np} \left[ xz_n^{(1)}(x) \right]' \\ \mu\tilde{m}z_n^{(1)}(\tilde{n}x)c_{mn} + \mu_{np}z_n^{(3)}(x)a_{mn} &= p_{mn}\mu_{np}z_n^{(1)}(x) \\ \left[ \tilde{n}xz_n^{(1)}(\tilde{n}x) \right]' c_{mn} + \tilde{n} \left[ xz_n^{(3)}(x) \right]' a_{mn} &= p_{mn} \left[ xz_n^{(1)}(x) \right]' \end{aligned} \quad (2.42)$$

Despejando  $a_{mn}$ ,  $b_{mn}$ ,  $c_{mn}$ ,  $d_{mn}$  se llega a que

$$\left. \begin{aligned} a_{mn} &= a_n p_{mn} \\ b_{mn} &= b_n q_{mn} \\ c_{mn} &= c_n q_{mn} \\ d_{mn} &= d_n p_{mn} \end{aligned} \right\} \frac{a_{mn}}{a_n} = \frac{d_{mn}}{d_n}, \frac{b_{mn}}{b_n} = \frac{c_{mn}}{c_n} \quad (2.43)$$

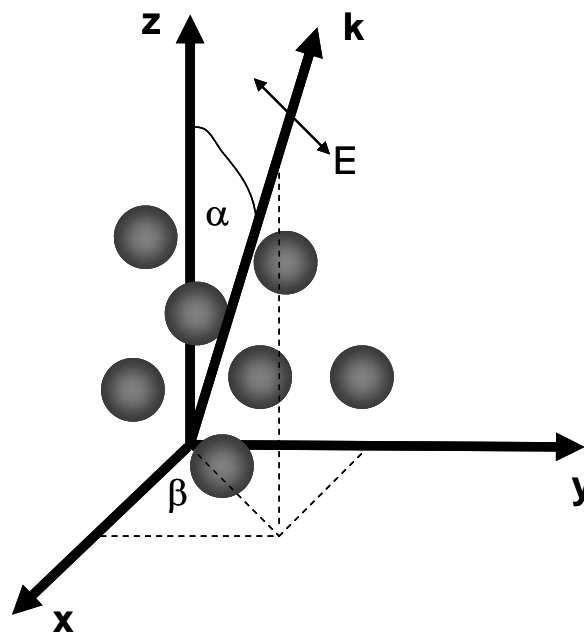
donde  $a_n$ ,  $b_n$ ,  $c_n$ ,  $d_n$  son los coeficientes definidos en (2.39). Queda claro además que los cuatro grupos no son independientes, producto del hecho que según (2.30)  $E$  y  $H$  dependen de los mismo coeficientes  $p_{mn}$  y  $q_{mn}$ .

Cuando se resuelve el problema numéricamente, la series infinitas (2.35), (2.37), (2.38) y (2.40) se suelen cortar en un dado  $N$  de corte ( $N_{corte}$ ) obtenido empíricamente y que es el entero mas próximo a

$$N_{\text{corte}} \approx x + 4x^{1/3} + 2 \quad (2.44)$$

## 2.4. Scattering de Mie para partículas acopladas

Una onda plana incide ahora sobre un cúmulo de partículas representadas en la **Figura 2-6**. Esta generalización de la teoría de Mie para muchas partículas (GMMie<sup>1</sup>) se basa en que, como se presentó en la sección anterior, es posible hallar la solución exacta al problema de una onda arbitraria (escrita como suma de AEV) incidiendo sobre una partícula en el origen. Sólo se debe encontrar la contribución proveniente de las otras partículas y escribirla como suma de AEV.



**Figura 2-6. Presentación del problema de GMMie.** Una onda plana incide sobre un sistema de partículas. La onda se propaga respecto a los ejes fijos y está polarizada como muestra la figura.

<sup>1</sup> Del inglés Generalized Multiparticle Mie. Xu 1995

Las ecuaciones de borde (2.36) son ahora un sistema (una para cada partícula  $i$ ) que vinculan los campos Internos, Incidentes y de Scattering propio y de todas otras las partículas ( $j$ ).

$$\begin{aligned} (\vec{E}_{inc,i} + \sum_{j \neq i} \vec{E}_{sca,j \rightarrow i} + \vec{E}_{sca,i} - \vec{E}_{int,i}) \times \hat{e}_r &= 0 \\ (\vec{H}_{inc,i} + \sum_{j \neq i} \vec{H}_{sca,j \rightarrow i} + \vec{H}_{sca,i} - \vec{H}_{int,i}) \times \hat{e}_r &= 0 \end{aligned} \quad (2.45)$$

La dificultad consiste en que al escribir la ecuación para una partícula es necesario reescribir los campos de las otras en las coordenadas de esta. Por la completitud de los AEV, no es difícil ver que es posible expandir cualquiera de ellos en una base como una suma de infinitos en otra base como se ve en la siguiente ecuación

$$\begin{aligned} \vec{M}_{mn}^{(3)}(i) &= \sum_{v=1}^{\infty} \sum_{\mu=-n}^n A_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \vec{M}_{\mu\nu}^{(1)}(j) + B_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \vec{N}_{\mu\nu}^{(1)}(j) \\ \vec{N}_{mn}^{(3)}(i) &= \sum_{v=1}^{\infty} \sum_{\mu=-n}^n B_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \vec{M}_{\mu\nu}^{(1)}(j) + A_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \vec{N}_{\mu\nu}^{(1)}(j) \end{aligned} \quad (2.46)$$

$A$  y  $B$ , denominados coeficientes de translación, son los factores de la expansión de los AEV con el origen en el centro de  $j$  en los AEV con el origen en el centro de  $i$ .<sup>1</sup>

En la ecuación de contorno generalizada (2.45) para el campo eléctrico pueden combinarse las expansiones de los campos de la misma forma que se hizo para el caso de la partícula individual en la sección anterior, agregando los campos de las demás partículas escritos según (2.46). El campo sobre la partícula  $i$  generado por el Scattering de las otras partículas puede escribirse como

$$\begin{aligned} \sum_{j \neq i} \vec{E}_{sca,j \rightarrow i} &= \sum_{j \neq i} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n a_{mn}(j) \left( \sum_{v=1}^{\infty} \sum_{\mu=-n}^n A_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \vec{M}_{\mu\nu}^{(1)}(i) + B_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \vec{N}_{\mu\nu}^{(1)}(i) \right) \\ &+ \sum_{j \neq i} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n b_{mn}(j) \left( \sum_{v=1}^{\infty} \sum_{\mu=-n}^n B_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \vec{M}_{\mu\nu}^{(1)}(i) + A_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \vec{N}_{\mu\nu}^{(1)}(i) \right) \end{aligned} \quad (2.47)$$

y algo análogo para el campo magnético. Intercambiando el orden de las sumatorias y reagrupando

$$\sum_{j \neq i} \vec{E}_{sca,j \rightarrow i} = \sum_{j \neq i} \sum_{v=1}^{\infty} \sum_{\mu=-n}^n \left( p_{\mu\nu}(j \rightarrow i) \vec{N}_{\mu\nu}^{(1)} + q_{\mu\nu}(j \rightarrow i) \vec{M}_{\mu\nu}^{(1)} \right) \quad (2.48)$$

donde se definió

---

<sup>1</sup> Ver Apéndice

$$\begin{aligned}
p_{\mu\nu}(j \rightarrow i) &= \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n a_{mn}(j) A_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) + b_{mn}(j) B_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \\
q_{\mu\nu}(j \rightarrow i) &= \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n b_{mn}(j) A_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) + a_{mn}(j) B_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i)
\end{aligned} \tag{2.49}$$

como los coeficientes de la acción del campo de Scattering de  $j$  sobre  $i$  en la base de  $i$ . Si se suma a (2.48) el campo incidente sobre  $i$  expandido según (2.33) siendo sus coeficientes  $p_{mn}(i)$  y  $q_{mn}(i)$ , se puede escribir el campo total como

$$\begin{aligned}
\vec{E}_{total}(i) &= \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n \left[ \left( p_{mn}(i) + \sum_{j \neq i} p_{mn}(j \rightarrow i) \right) \vec{N}_{mn}^{(1)} + \right. \\
&\quad \left. \left( q_{mn}(i) + \sum_{j \neq i} q_{mn}(j \rightarrow i) \right) \vec{M}_{mn}^{(1)} \right] \\
&= \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n \left[ \tilde{p}_{mn}(i) \vec{N}_{mn}^{(1)} + \tilde{q}_{mn}(i) \vec{M}_{mn}^{(1)} \right]
\end{aligned} \tag{2.50}$$

y de forma análoga para  $H$ . Habiendo llegado a esta expresión puede usarse la solución al problema de Scattering cuando se incide con una onda arbitraria sobre la partícula. La ecuación (2.43) queda entonces

$$\begin{aligned}
a_{mn}(i) &= a_n \tilde{p}_{mn}(i) \\
b_{mn}(i) &= b_n \tilde{q}_{mn}(i)
\end{aligned} \tag{2.51}$$

para cada una de las partículas que componen el conjunto. Una vez obtenidos los coeficientes de interacción en las coordenadas de las partículas se trasladan a un sistema de coordenadas común  $o$  llamado coordenadas del *cluster* y cuyo origen coincide usualmente el centro geométrico del mismo.

$$\begin{aligned}
a_{mn}(o) &= \sum_i \sum_{\nu=1}^{\infty} \sum_{\mu=-n}^n a_{mn}(i) A_{mn}^{\mu\nu}(i \rightarrow o) + b_{mn}(i) B_{mn}^{\mu\nu}(i \rightarrow o) \\
b_{mn}(o) &= \sum_i \sum_{\nu=1}^{\infty} \sum_{\mu=-n}^n b_{mn}(i) A_{mn}^{\mu\nu}(i \rightarrow o) + a_{mn}(i) B_{mn}^{\mu\nu}(i \rightarrow o)
\end{aligned} \tag{2.52}$$

La versión general para las secciones eficaces

$$\begin{aligned}
C_{sca} &= \frac{4\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n n(n+1)(2n+1) \frac{(n-m)!}{(n+m)!} \left( |a_{mn}|^2 + |b_{mn}|^2 \right) \\
C_{ext} &= \frac{4\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n n(n+1)(2n+1) \frac{(n-m)!}{(n+m)!} \operatorname{Re} \left( p_{mn}^* a_{mn} + q_{mn}^* b_{mn} \right)
\end{aligned} \tag{2.53}$$

donde  $p$ ,  $q$ ,  $a$  y  $b$  corresponden a las coordenadas del cúmulo.

### 2.4.a. Acerca de la resolución numérica de GMMie

La compacta relación (2.51) es en realidad un sistema infinito de ecuaciones lineales acopladas. La resolución numérica presenta algunos problemas:

- Utilizando algún criterio, es necesario truncar la serie de infinitos armónicos esféricos. Se podría hacerlo siguiendo el criterio de Wiscombe expuesto en la ecuación (2.44), pero esto no siempre es suficiente ya que no sólo debe satisfacerse la correcta descripción del campo de la partícula única sino también del campo incidente y de Scattering de las otras en la posición de la partícula. No sólo es importante el tamaño de las partículas, sino también la distancia al origen de coordenadas y entre ellas. Es por este motivo que se toma el centro geométrico del cúmulo como sistema común al ser, en general, el óptimo para reducir la cantidad de órdenes a calcular.
- Una vez truncadas las series (suponiendo que todas se truncan en el mismo  $N_{corte}$ ) queda el número de coeficientes de interacción y de ecuaciones cuadrado es el cuadrado de  $2N_{parts}N_{corte}(N_{corte}+2)$  ( $O[N_{parts}^2 N_{corte}^4]$ ). Formalmente el sistema puede ser escrito en forma matricial e invirtiendo esta matriz se obtienen los coeficientes de interacción. Cuando el número de esferas y, especialmente, de órdenes es excesivamente grande este paso puede ser muy demandante computacionalmente, tanto en requerimientos de procesador como de memoria.
- En el cálculo de los coeficientes de translación suelen utilizarse esquemas de recurrencia para calcular los valores de las distintas funciones y los coeficientes de Gaunt (emparentados con los Clebsch-Gordan) involucrados en el cálculo de los coeficientes de translación. Algunos de estos esquemas son inestables por problemas de truncamiento si se calculan para órdenes muy altos.<sup>1</sup> Aumentar el  $N_{corte}$  indefinidamente no siempre mejorará la calidad de la solución debiéndose verificar en cada caso la convergencia. También para el cálculo de estos coeficientes se usa la

---

<sup>1</sup> Kattawar 1967

descomposición de la translación en una rotación seguida una translación en el eje  $z$  y una rotación,<sup>1</sup> que reduce el problema a  $O[N_{parts}^2 N_{corte}^3]$ .

- Habiendo obtenido  $a_{mn}$  y  $b_{mn}$ , deben calcularse las secciones eficaces para el cluster. Para llevarlo a cabo es preciso trasladar los coeficientes a un centro común y esto conlleva nuevamente los problemas arriba mencionados.

Si bien algunos de estos puntos no son de gravedad en esta tesis por ser sólo dos las partículas involucradas, es importante conocer las restricciones de los métodos numéricos involucrados para su correcta aplicación. En este trabajo se resuelve (2.51) utilizando un esquema iterativo. Partiendo de los valores  $a_{mn}$  y  $b_{mn}$  para las partículas aisladas se calcula  $\tilde{p}_{mn}$  y  $\tilde{q}_{mn}$ , y luego nuevamente  $a_{mn}$  y  $b_{mn}$ . Con estos nuevos valores para los coeficientes de interacción se repite el procedimiento hasta la variación sea menor que un umbral. Si bien el procedimiento es más lento ya que se calcula  $\tilde{p}_{mn}$  y  $\tilde{q}_{mn}$  en cada iteración es conveniente en la mayoría de los casos ya que no se almacena la matriz entera.

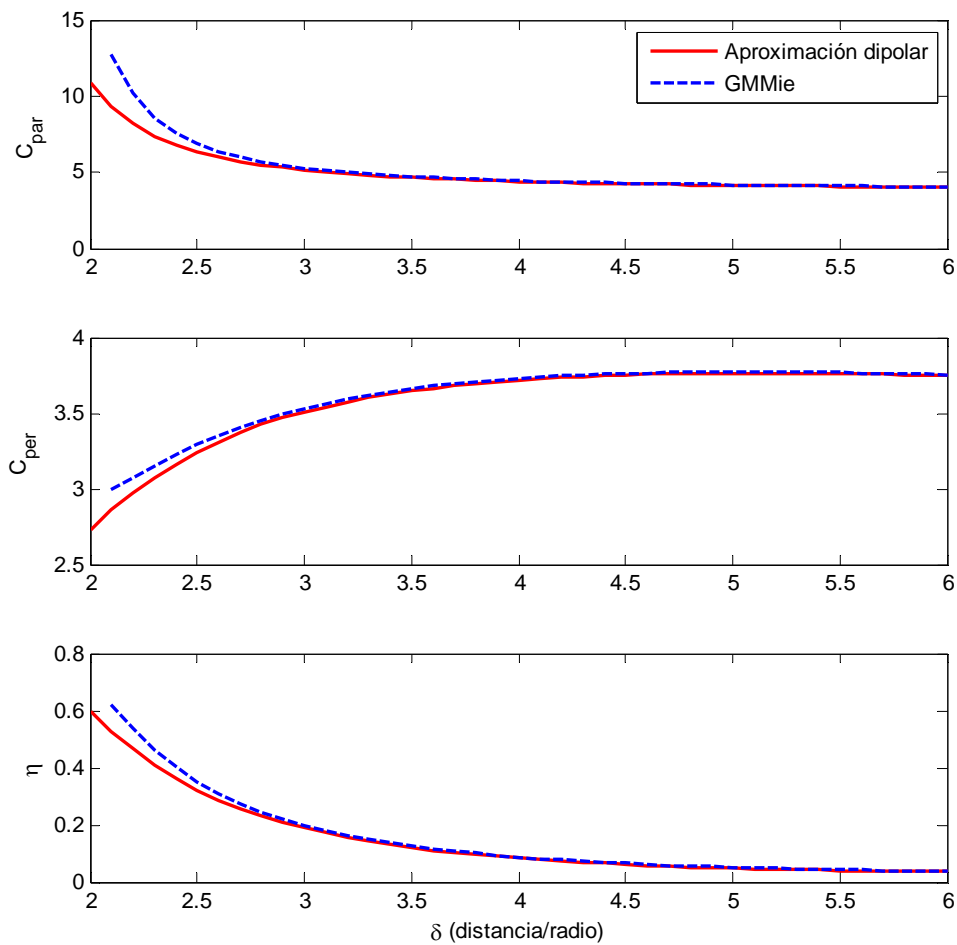
#### 2.4.b. Resultados de GMMie para el caso de dos partículas

En la **Figura 2-7** se compara el resultado de GMMie con la aproximación dipolar para una onda plana linealmente polarizada ( $\lambda = 532\text{nm}$ ) incidiendo sobre un dímero compuesto por nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro. Se observa, como era previsto, que la diferencia sólo es significativa cuando están muy próximas. Si bien a partir de este gráfico daría la impresión que basta con usar la aproximación dipolar, es importante recalcar que, por ejemplo, para nanopartículas de 80 nm (muy usadas en microscopía) la diferencia aumenta un factor 10.

---

<sup>1</sup> Mackowski 1991





**Figura 2-7. Aproximación Dipolar vs GMMie.** El dímero está compuesto por partículas de oro de 20 nm de diámetro y se incide con una onda plana linealmente polarizada cuya longitud de onda es 532 nm. Como era de esperarse se observa una diferencia sólo cuando las partículas están muy próximas. Para partículas 4 veces más grandes la diferencia puede aumentar hasta un factor 10 para distancias cortas.

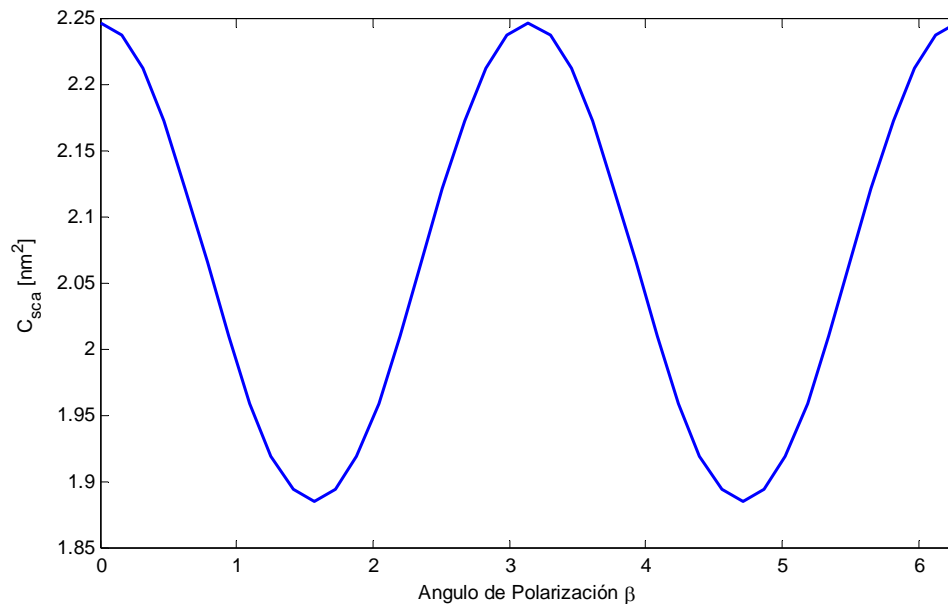
En la **Figura 2-8** se muestra la sección eficaz de Scattering en función del ángulo entre la polarización y el eje del dímero. La periodicidad de la respuesta es la esperada por la simetría del sistema. De este gráfico puede medirse:<sup>1</sup>

- La orientación del dímero en el plano buscando la polarización para la cual la señal es máxima
- La distancia entre las partículas del valor de la anisotropía (si se suponen las partículas de tamaño conocido).

<sup>1</sup> Grecco 2006

- La distancia entre las partículas y el radio de cada una, de la anisotropía y el valor medio.

En la sección análisis de resultados se discutirá con más detalle los distintos aspectos a considerar para obtener de la medición los parámetros del dímero.



**Figura 2-8. Sección eficaz de Scattering vs. Polarización** para un dímero de oro formado por partículas de 20 nm ubicadas a 30 nm entre centros. Al rotar la polarización de la onda incidente, la respuesta del sistema oscila con un periodo de  $\pi$ . Se obtienen valores máximos cuando la polarización coincide con la dirección del dímero y mínimos cuando es perpendicular. Para un homodímero, la anisotropía está unívocamente relacionada con las distancias entre las partículas.

## 2.5. Otros formalismos multipolares

Existen otros formalismos equivalentes al presentado que difieren únicamente en la forma de escribir y resolver el acoplamiento.

En el denominado Orden de Scattering<sup>1</sup> se reduce la interacción de todas las partículas entre sí a una secuencia de interacción de pares. Del campo incidente ( $E_{inc}$ ) se calcula el Scattering de una partícula, y con la suma de ambos campos, el de una segunda. Se recalcula para la primera partícula tomando en cuenta ahora el recientemente calculado campo de la segunda. Se repite el proceso hasta que se converge a una solución.

<sup>1</sup> Fuller 1988a, Fuller 1988b

Otro muy difundido es el denominado T-Matrix y en el que se reescribe la ecuación (2.51) como:

$$\begin{bmatrix} a_{mn}(i) \\ b_{mn}(i) \end{bmatrix} = T(i, j) \begin{bmatrix} p_{mn}(i) \\ q_{mn}(i) \end{bmatrix} \quad (2.54)$$

(nótese que se indica  $p$  y  $q$ , y no  $\tilde{p}$  y  $\tilde{q}$ ). El sistema puede reducirse trasladando todas las ecuaciones a las coordenadas del cúmulo:

$$\begin{bmatrix} a_{mn}(o) \\ b_{mn}(o) \end{bmatrix} = T(o) \begin{bmatrix} p_{mn}(o) \\ q_{mn}(o) \end{bmatrix} \quad (2.55)$$

De las propiedades de la matriz  $T(o)$  pueden calcularse la secciones eficaces para orientaciones al azar del cúmulo y resolviendo el sistema puede usarse (2.53) para encontrarlas para un orientación particular.

## **2.6. Comparación con otro formalismo no multipolar**

La aproximación por dipolos discretos que (DDA<sup>1</sup>) consiste en realizar numéricamente la operación conceptual propuesta en el comienzo de este capítulo. La calidad del cálculo estará determinada por la grilla utilizada para discretizar la partícula. El objetivo es encontrar la orientación y el valor del dipolo en cada elemento de volumen. Los multipolos del campo están implícitos en el hecho de que se ubican en la esfera muchos dipolos que toman distintos valores. La principal ventaja respecto del método presentado anteriormente es la capacidad de describir partículas con formas arbitrarias. Sin embargo, dado que en esta tesis nos circunscribimos a partículas esféricas, GMMie es un método más eficiente que DDA ya que utiliza los resultados de la teoría de Mie para esta simetría.

---

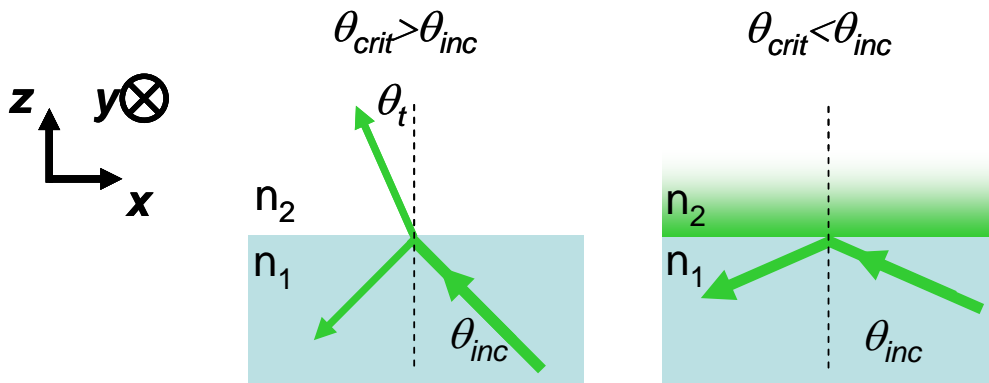
<sup>1</sup> Del inglés Discrete-Dipole Aproximation. Purcell 1973, Draine 1988, Draine 1994

En este capítulo se presenta el dispositivo experimental y el principio de funcionamiento del mismo. Se describe cada una de las partes del mismo y se muestran las distintas calibraciones y verificaciones realizadas.

### 3. Dispositivo Experimental

El dispositivo experimental consta de un microscopio convencional<sup>1</sup> modificado para poder usarse con iluminación por reflexión total interna (RTI). En un proceso de refracción de un medio con índice  $n_1$  a uno con  $n_2$ , la relación entre el ángulo de incidencia y el transmitido está dada por la ley de Snell.

$$n_1 \text{sen}(\theta_{inc}) = n_2 \text{sen}(\theta_t) \quad (3.1)$$



**Figura 3-1. Reflexión Total Interna.** Cuando una onda incide en una interfase se refleja y refracta siguiendo la ley de Snell. Cuando el índice de incidencia es mayor al de refracción, existe un ángulo, determinado crítico para el cual el haz se refleja completamente y se genera sobre la superficie una onda evanescente.

Cuando  $n_1$  es mayor que  $n_2$ , existe un ángulo de incidencia, denominado crítico ( $\theta_{crit} = \arcsin(n_2/n_1)$ ) a partir del cual el seno del ángulo transmitido toma valores mayores a la unidad, el haz se refleja totalmente y en el segundo medio se

<sup>1</sup> IX71. Olympus Corporation. Tokio (Japón)

genera una onda evanescente (**Figura 3-1**). Dado que ésta decae exponencialmente con la distancia al cubreobjeto, sólo se ilumina un pequeño volumen por sobre la superficie del mismo, disminuyendo así enormemente el fondo.

La expresión para el campo de la onda evanescente es<sup>1</sup>

$$\begin{aligned} E_{\parallel} &= \left[ \frac{2 \cos(\theta) \sqrt{\sin^2(\theta) - n^2}}{\sqrt{n^4 \cos^2(\theta) + \sin^2(\theta) - n^2}} \right] A_{\parallel} e^{-i(\delta_{\parallel} + \pi/2)} \\ E_{\perp} &= \left[ \frac{2 \cos(\theta)}{\sqrt{1 - n^2}} \right] A_{\perp} e^{-i\delta_{\perp}} \\ E_z &= \left[ \frac{2 \cos(\theta) \sin(\theta)}{\sqrt{n^4 \cos^2(\theta) + \sin^2(\theta) - n^2}} \right] A_{\parallel} e^{-i\delta_{\parallel}} \end{aligned} \quad (3.2)$$

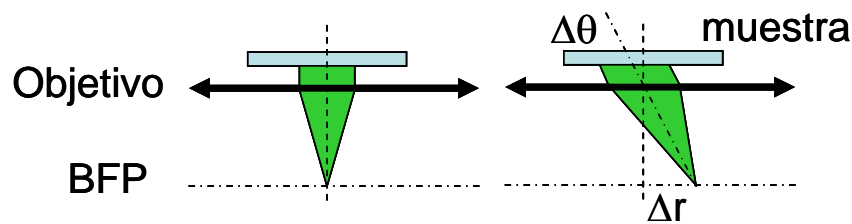
con

$$\tan(\delta_{\parallel}) = \frac{\sqrt{\sin^2(\theta) - n^2}}{n \cos(\theta)}, \quad \tan(\delta_{\perp}) = \frac{\sqrt{\sin^2(\theta) - n^2}}{\cos(\theta)}, \quad n = n_2/n_1$$

$\theta \equiv \theta_{inc} \equiv$  ángulo de incidencia

donde paralelo y perpendicular se refieren al plano de incidencia. De (3.2) se desprende que la transmisión y la longitud de penetración dependen de la polarización. Dado que para poder medir la anisotropía es preciso rotarla, se diseñó un dispositivo para tal fin.

En un microscopio convencional se enfoca el haz mediante una lente en el foco imagen (BFP<sup>2</sup>) del objetivo de forma tal que salga colimado e ilumine toda la muestra en forma pareja (**Figura 3-2a**). Puede modificarse el ángulo de incidencia ( $\theta_{inc}$ ) a la muestra enfocando el haz fuera del eje (**Figura 3-2b**).



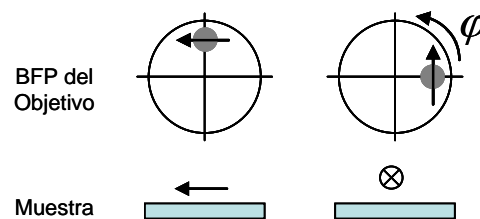
**Figura 3-2. Iluminación en un microscopio TIR.** En un microscopio convencional el haz se enfoca en el foco imagen del objetivo de forma tal que sale colimado. Para modificar el ángulo de incidencia en la muestra, se cambia el punto del BFP donde se enfoca, pudiéndose alcanzar el ángulo crítico si el objetivo tiene una apertura numérica suficiente.

<sup>1</sup> Axelrod 1984

<sup>2</sup> Del inglés back focal plane

Cuando el desplazamiento es suficientemente grande, el ángulo supera el valor crítico entrando en RTI. Para que esto suceda es necesario utilizar un objetivo de apertura numérica grande para no bloquear el haz.<sup>1</sup>

La descrita es la disposición usual de un microscopio por RTI, pero no permite controlar la polarización de la onda evanescente. Girar un polarizador antes del objetivo no es suficiente dado que la componente que está en el plano de incidencia (radial) no se propaga eficientemente a la onda evanescente como muestra (3.2). Para esto es necesario, además de rotar  $\pi/2$  la polarización, cambiar el plano de incidencia moviendo el haz en el BFP un cuarto de vuelta ( $\varphi$ ) sobre un círculo imaginario con centro en el eje del objetivo. De esta forma, la componente radial pasa a ser tangencial como muestra la **Figura 3-3**. Para evitar tener que rotar la polarización antes de entrar al microscopio se propone llegar al objetivo con luz circularmente polarizada de forma tal que la transmisión selectiva de la RTI elija la componente deseada según el punto de incidencia.

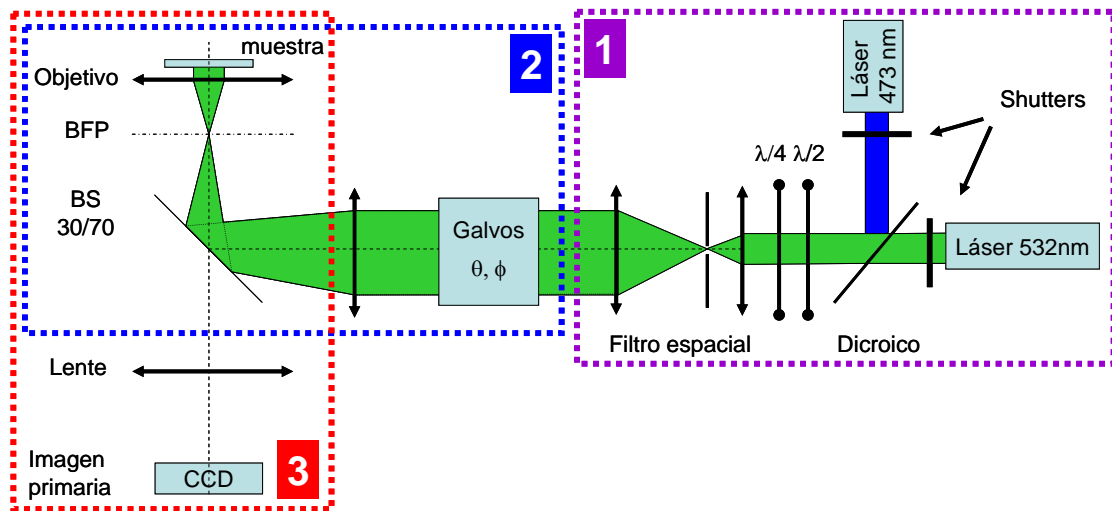


**Figura 3-3. Esquema para rotar la polarización en TIR.** Debido a que la transmisión de la onda evanescente para la componente en el plano de incidencia es muy pequeña, no es posible rotar la polarización de entrada para cambiarla sobre la muestra. Para este fin es preciso además mover un cuarto de vuelta el punto de incidencia al BFP de forma tal que la componente que radial sea ahora tangencial.

En la **Figura 3-4** se presenta un esquema completo del dispositivo experimental dividido en tres partes. Todas las funciones del microscopio que se utilizan (incluyendo la apertura y cierre de los obturadores, el control de los galvanómetros y la adquisición con la cámara) son controladas por un programa hecho *ad hoc* en LabVIEW<sup>2</sup>. A través de él se puede adquirir una secuencia de imágenes variando la polarización incidente y alternando los láseres.

<sup>1</sup> Se usa un objetivo diseñado para tal fin: TIRFM 63X/1.45. Olympus Corporation. Tokio (Japón)

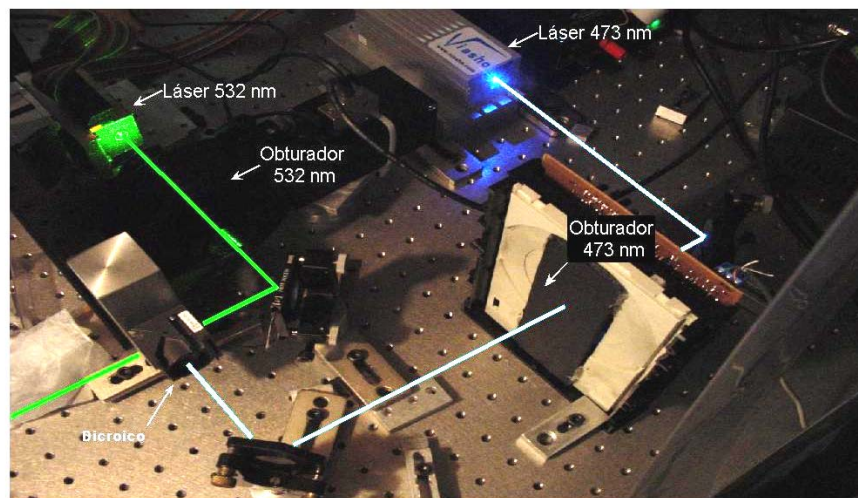
<sup>2</sup> LabView 7.1. National Instruments. Austin, Texas (USA)



**Figura 3-4. Esquema del dispositivo experimental.** (1) Iluminación: láseres, ajuste de la polarización y filtrado espacial. (2) Posicionamiento y movimiento del haz (3) Detección

En las siguientes secciones se analizará cada una de ellas en detalle.

### 3.1. Iluminación



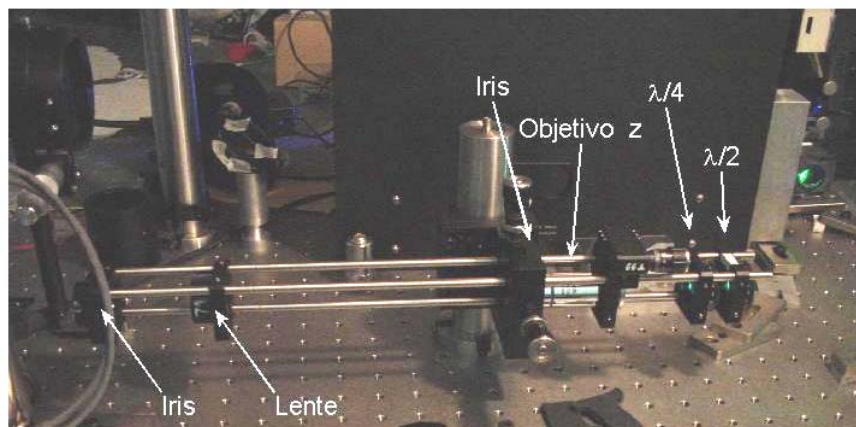
**Figura 3-5. Iluminación.** Fotografía de los láseres (con sus respectivos obturadores) combinados con un filtro dicroico.

Con el fin de poder tomar imágenes con distintas longitudes de onda cercanas a la resonancia se combinan dos láseres. Se utiliza un láser de Nd:Yag doblado que emite en 532 nm.<sup>1</sup> La polarización es paralela a la mesa óptica.

<sup>1</sup> Compass C315M. Coherent Inc . Santa Clara, California (USA)

Mediante un filtro dicroico<sup>1</sup>, se combina con un láser de estado sólido bombeado por diodos<sup>2</sup> (473 nm). La polarización de éste también se fija paralela a la mesa. Se instalaron sendos obturadores mecánicos controlados por la PC para poder alternar los láseres. (**Figura 3-5**)

Para controlar la polarización de entrada al objetivo se pone una lámina de media onda<sup>3</sup>, seguida de una lámina de cuarto de onda<sup>4</sup>, montadas sobre sendos posicionadores angulares con resolución de un grado. Dado que la óptica ubicada antes del objetivo no transmite con la misma eficiencia ambas polarizaciones, es necesario precompensar. Para realizar esto se midió la matriz de polarización del microscopio (sin objetivo) y se calcularon los ángulos que deberían tener las láminas retardadoras. Ubicadas en esos ángulos se obtuvo luz elípticamente polarizada con una diferencia de amplitud entre sus componentes menor al 8%. Este número es consistente con la resolución de los posicionadores angulares utilizados (1°). Esto se verificó para las dos longitudes de onda utilizadas.



**Figura 3-6. Iluminación.** Fotografía de la etapa precompensación de la polarización y filtrado espacial.

Los haces combinados pasan por un filtro espacial para lograr una iluminación uniforme en la muestra. La luz es enfocada con un objetivo 40X en un iris de 20  $\mu\text{m}$  y colectada con una lente 200 mm de distancia focal. Además de filtrar, en este paso se ajusta la cintura del haz de entrada a 5,9 mm, que permite

<sup>1</sup> 452888. Carl Zeiss. Jena (Alemania)

<sup>2</sup> VA-I-N-473. Viasho Technology. Beijing (China)

<sup>3</sup> AHWP05M-630. Thorlabs. Newton, New Jersey (USA)

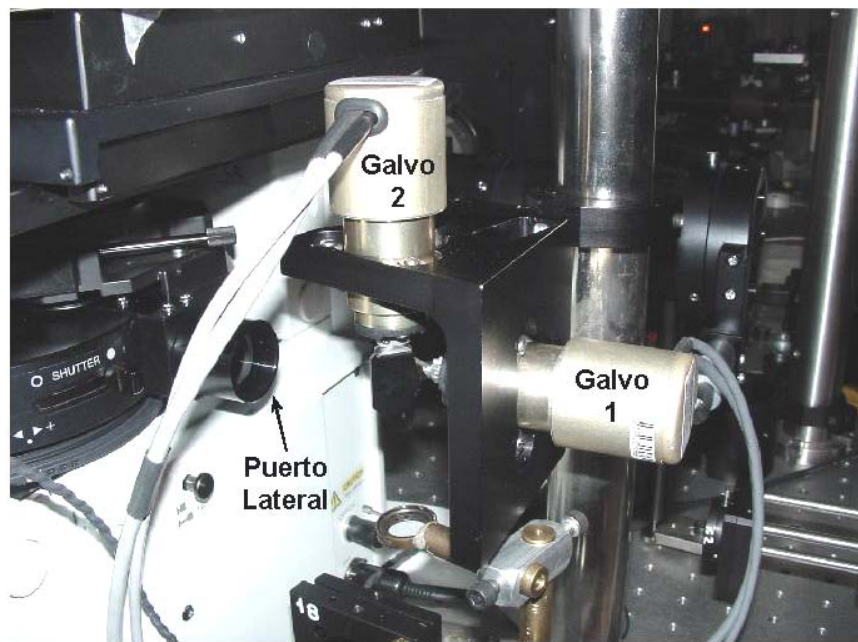
<sup>4</sup> AQWP05M-630. Thorlabs. Newton, New Jersey (USA)



enfocar a  $18,5\mu\text{m}$  en el BFP y así tener un área iluminada en la muestra de  $100\times 100\mu\text{m}$ . Después de esta etapa, la potencia es de  $\sim 60\mu\text{W}$ . (**Figura 3-6**)

### 3.2. Posicionamiento del haz

El láser ingresa colimado en el sistema óptico del microscopio a través de un puerto lateral ubicado en la torreta de filtros, el cual contiene una lente que enfoca el BFP. Para poder variar el punto de incidencia se instalaron galvanómetros<sup>1</sup> en ejes perpendiculares que, al combinarse, permiten barrer un cono de aproximadamente  $30^\circ$ . Si bien los puntos de pivote de los galvanómetros no coinciden en el espacio, la separación entre ellos es del orden del parámetro confocal de la lente, motivo por el cual puede tratárselos como superpuestos. (**Figura 3-7**)

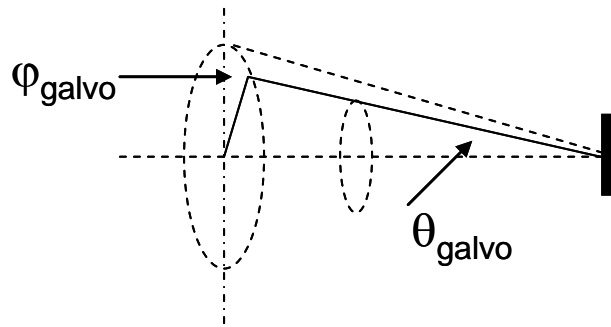


**Figura 3-7. Posicionamiento del haz.** Fotografía de los galvanómetros montados en el puerto lateral del microscopio.

---

<sup>1</sup> Controladora: SC2000. Amplificador (2): Minisax. Galvanómetros (2): M2. GSI Group. Moorpark, California (USA)

Los ángulos  $\theta_{galvo}$  y  $\varphi_{galvo}$ <sup>1</sup> (ver definición en **Figura 3-8**) determinan el punto de incidencia en el BFP y por lo tanto el ángulo de incidencia a la muestra.



**Figura 3-8. Definición de los ángulos del Galvanómetro.** Dos galvanómetros en ejes perpendiculares se combinan para mover el haz en un cono. La dirección del haz de salida queda definida por los ángulos que se muestran en la figura. El ángulo  $\varphi$  se usará para rotar la polarización efectiva sobre la muestra y el  $\theta$  para cambiar el ángulo de incidencia.

Propagando el haz por el sistema óptico pueden vincularse estos ángulos

$$\tan(\theta_{inc}) = \frac{f_{lente}}{f_{obj}} \tan(\theta_{galvo})$$

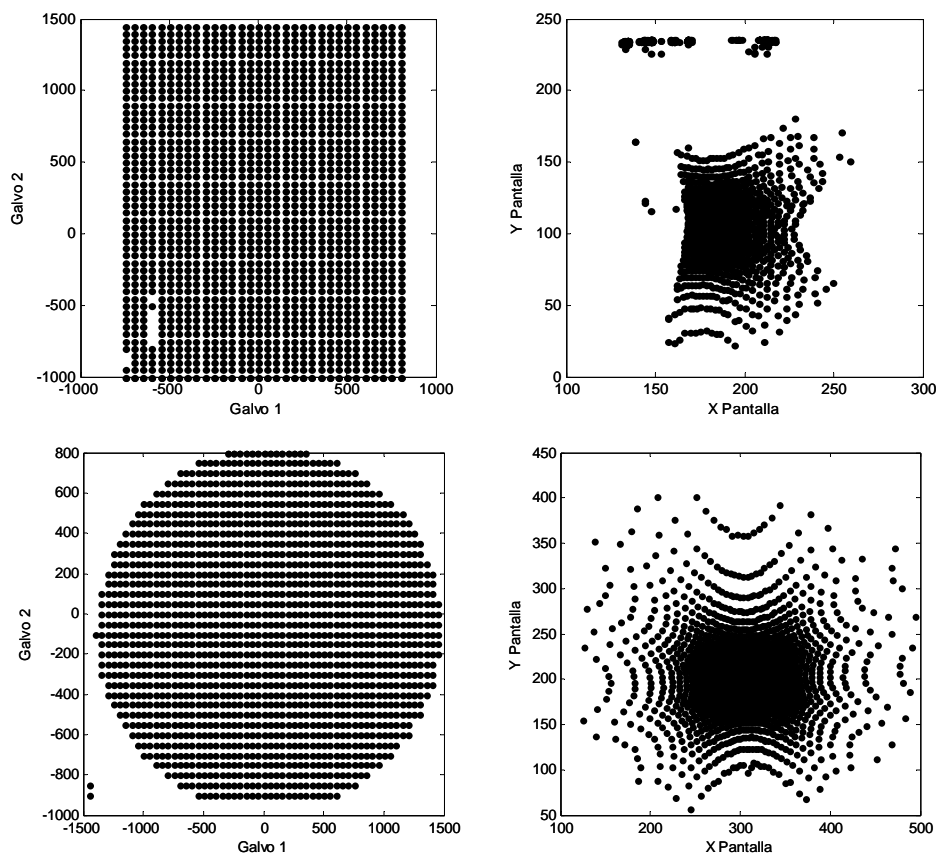
$$\varphi_{inc} = \varphi_{galvo}$$
(3.3)

El centrado del haz es crucial para asegurar la uniformidad de la iluminación durante el giro dado que la transmisión depende fuertemente del ángulo  $\Delta\theta$  (que a su vez depende de  $\Delta r$ ).

La tarea tiene dos aspectos: hacer pasar el haz por el eje del objetivo cuando los galvanómetros están en la posición central y mover los galvanómetros en un círculo sobre el BFP. En primer lugar se alineó el haz de forma tal que los puntos de incidencia con y sin objetivo coincidieran en un plano muy lejano, perpendicular al eje de propagación. Una vez hecho esto se ubicó una cámara CCD sobre el microscopio y una pantalla graduada semitranslúcida a 25 mm por sobre el objetivo. Con el láser encendido se realizó un barrido con los galvanómetros y para cada posición se tomó una imagen de la pantalla.

<sup>1</sup> Estos ángulos de interés se calculan a partir de los ángulos de los galvanómetros ( $\alpha$  para el eje vertical,  $\beta$  para el horizontal)  $\tan(\theta_{galvo}) = \sqrt{\tan^2(\alpha) + \tan^2(\beta)}$ ,  $\tan(\varphi_{galvo}) = \frac{\tan(\alpha)}{\tan(\beta)}$ . Estos a su vez se relacionan con el voltaje aplicado a través de una calibración, que es diferente para cada uno.

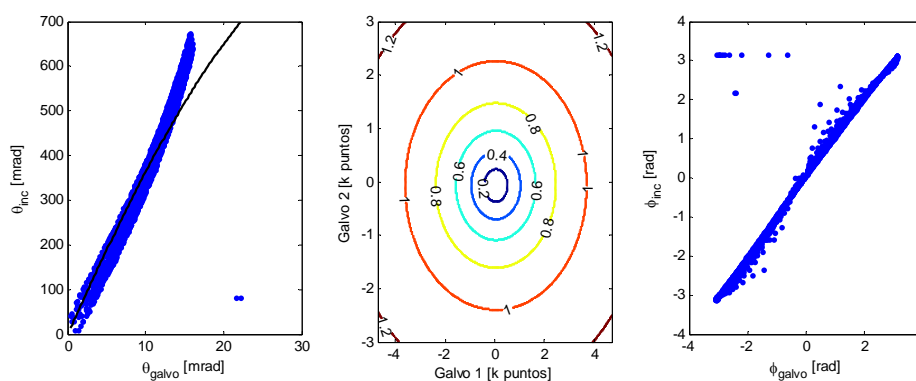
Se realizó en Matlab<sup>1</sup> un programa para procesar las imágenes, obteniéndose de cada una el lugar donde incidió el haz. En la **Figura 3-9** (arriba) se ve un patrón asimétrico propio del sistema desalineado. A la izquierda, en coordenadas de los galvanómetros cada punto representa una imagen adquirida. A la derecha, para cada una de las imágenes se gráfica en coordenadas de la pantalla el punto donde incidió el haz. Se corrigió la alineación y se obtuvo el patrón de que se muestra en la **Figura 3-9** (abajo). Este proceso de diagnóstico se aplicó cada vez que se modificó algún parámetro del sistema.



**Figura 3-9. Resultados de la calibración.** Los galvanómetros se mueven y se registra la posición del haz en una pantalla ubicada arriba del objetivo. (izquierda) posiciones del galvanómetro. (derecha) posiciones en la pantalla. (arriba) sistema desalineado. (abajo) sistema alineado. Para ángulos grandes, el haz no es registrado por la cámara. Estos puntos son presentados en el gráfico superior derecho en el borde superior de la figura, mientras que fueron removidos en el inferior derecho. Es por esto que la parte superior izquierda muestra toda el área barrida por los galvanómetros (cuadrado) mientras que la inferior izquierda muestra sólo aquellos ángulos donde se registró un punto en la pantalla (círculo)

<sup>1</sup> Matlab R2006a. Mathworks. Natick, Massachussets (USA)

Finalmente se puso un cubreobjeto y aceite sobre el objetivo y se realizó el mismo procedimiento. En la **Figura 3-10** se observa el ángulo de salida del cubreobjeto (medido a partir de la posición del haz en la pantalla) para cada  $\theta_{galvo}$ . Se observa que para ángulos chicos la medición coincide con la predicción hecha a partir de los parámetros medidos del sistema (calibración de los galvanómetros, distancias focales involucradas, etc.). La diferencia a ángulos grandes se debe a que en estos casos el haz produce sobre la pantalla una mancha oblonga que distorsiona su localización.



**Figura 3-10. Calibración de los Galvanómetros en el microscopio.** Se muestra la dirección del haz en función de los ángulos de los galvanómetros (ver texto) (izquierda) Resultado experimental (puntos) de  $\theta_{inc}$  vs.  $\theta_{galvo}$  comparado con el resultado teórico (línea). La diferencia para ángulos grandes se debe a que el láser sobre la pantalla presenta una mancha oblonga. (centro) Curvas de nivel de  $\theta_{inc}$  vs. coordenadas de los galvanómetros. (derecha)  $\phi_{inc}$  vs.  $\phi_{galvo}$ .

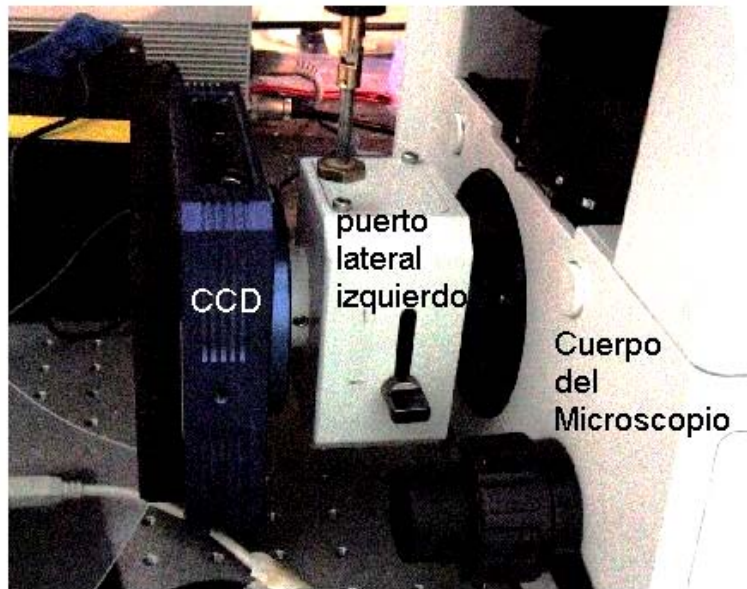
### 3.3. Detección

La potencia de los láseres es aproximadamente  $13 \mu w$  después del objetivo. A través de este y de una lente se forma imagen de la muestra en una cámara CCD<sup>1</sup> (**Figura 3-11**), previo paso por un divisor de haz 30/70.<sup>2</sup> En la mayoría de las aplicaciones de la fluorescencia la eficiencia del detector es su característica esencial: dado que el número de fotones es limitado es importante contarlos todos. En la microscopía por Scattering, la característica más importante es el rango dinámico que permite distinguir una contribución generalmente pequeña de la señal sobre un fondo mucho mayor. El valor efectivo de este parámetro se obtiene

<sup>1</sup> Alta U32. Apogee Instruments. Roseville, California (USA)

<sup>2</sup> 21009. Chroma Technology. Rockingham, Vermont (USA)

de dividir el ruido por el máximo rango. Para un chip CCD con una capacidad de 55.000 (superior a la de las cámaras de su tipo), se midió el ruido de la cámara<sup>1</sup> obteniéndose 16 y 31 electrones digitalizando a 16 y 12 bits respectivamente. La razón es de 3.437 y 1.774 mostrando que la resolución real es de 12 y 11.



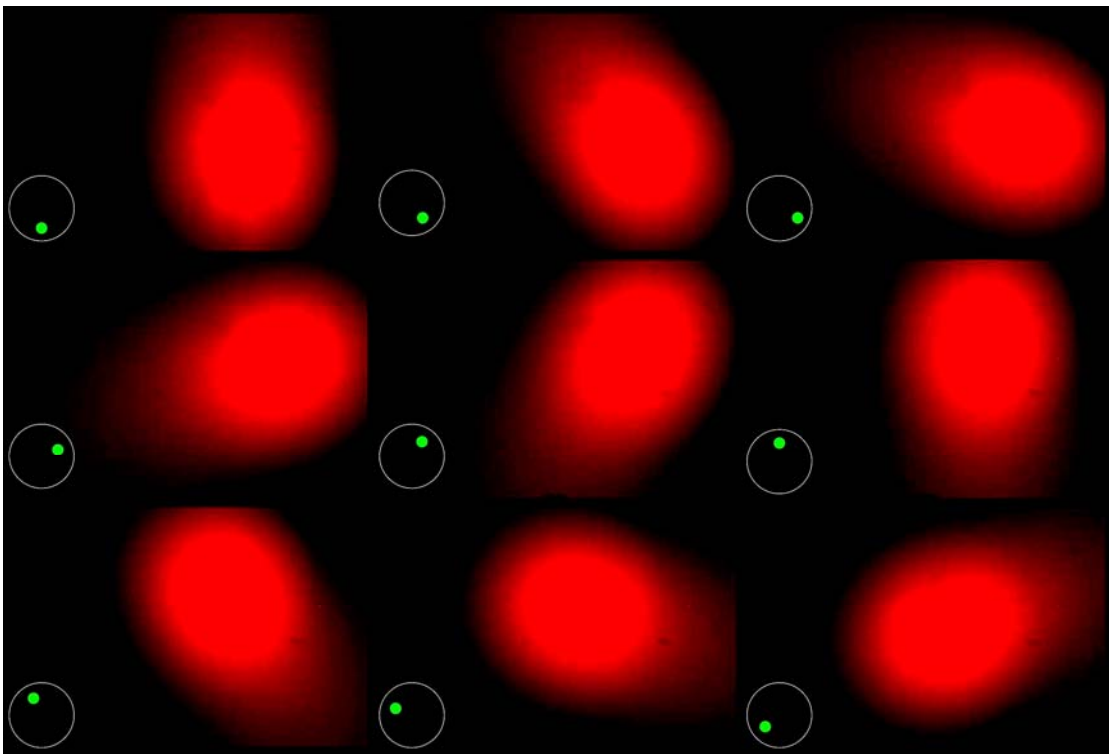
**Figura 3-11. Detección.** Fotografía de la cámara Apogee Alta U32 ubicada en el puerto inferior izquierdo del microscopio.

Además de la calibración angular también es necesario medir otros parámetros del sistema experimental que son relevantes para el ajuste de los datos. Uno de ellos es la uniformidad de la iluminación al rotar la polarización. Aún cuando la alineación es perfecta, no todo el campo visual es iluminado homogéneamente. La proyección del haz sobre el cubreobjeto es una elipse que al iluminar desde distintos ángulos rota con eje cercano a uno de sus focos. Sólo la región vecina al eje permanecerá iluminada para todos los ángulos de incidencia. Aún en esta zona se observarán variaciones si: (a) el barrido no es un círculo perfecto en el BFP, (b) la luz no es circularmente polarizada o (c) el haz no es homogéneo. Dado que lo que se pretende medir son las variaciones de la intensidad en función  $\varphi_{galvo}$  (que fija la polarización), es menester contar con una medición de las propias del sistema.

---

<sup>1</sup> van Vliet 1998

Para realizar esta caracterización se llenó una cubeta<sup>1</sup> con solución 1,7  $\mu\text{M}$  Rodamina 101 ( $\lambda_{ex} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$ ). Por ser una solución homogénea, la uniformidad de la imagen dependerá únicamente de la iluminación. Antes de la cámara se agregó un filtro dicróico<sup>2</sup> que refleja longitud de onda de excitación y transmite la fluorescencia. Para un dado  $\theta_{galvo}$ , se realizó un barrido en  $\phi_{galvo}$  tomando una imagen para cada ángulo. Para distintos  $\theta_{galvo}$  se repite el procedimiento. Un ejemplo de esta secuencia se ve en la **Figura 3-12**



**Figura 3-12. Secuencia de calibración de la anisotropía de fondo.** Se mide la fluorescencia proveniente de una cubeta de Rodamina 101 en solución al iluminar desde distintos ángulos. El círculo grande en la esquina inferior izquierda de cada cuadro simboliza en BFP y el más pequeño, el haz incidente. El punto de enfoque rota y para cada ángulo se toma una imagen. Se observa una región central que permanece iluminada constantemente y una periférica cuya intensidad varía. Las imágenes son de 250 x 180  $\mu\text{m}$ .

Con estos datos se analiza el contenido armónico<sup>3</sup> en  $\varphi$  para cada punto de la imagen. La cámara tiene 2148x1472 píxeles, y se toman 20 imágenes para cada

<sup>1</sup> Lab-Tek 155411. Nalge Nunc Internacional. Rochester, New York (USA)

<sup>2</sup> XF2009 550DCLP. Chroma Technology. Rockingham, Vermont (USA)

<sup>3</sup> De aquí en adelante cuando nos referimos al contenido armónico siempre es variando el ángulo  $\varphi$  en la secuencia, y no al espectro 2D de la imagen, ni al espectro en longitudes de onda.

$\theta_{\text{galvo}}$ , una secuencia tiene un total aproximado 63 millones de datos, es decir que ocupará 480 Mb en una representación computacional de tipo doble. Su transformada de Fourier por ser compleja, ocupará casi un Gb.<sup>1</sup>

Recordando que la presencia de un dímero se verá evidenciada por la aparición de una señal que se repita dos veces por vuelta (simetría  $\pi$ ), es claro que el cálculo de todas las componentes es innecesario. Sólo es necesario calcular los coeficientes del fundamental (valor medio) y los primeros dos armónicos, así como también la desviación estándar, para poder estimar la homogeneidad de la iluminación y la señal inherente con simetría  $\pi$ . Para evitar los problemas de memoria aparejados con el manejo simultáneo de estas imágenes, se aplicó una estrategia de cálculo secuencial en la cual cada imagen es leída del disco rígido, sus valores añadidos a los distintos coeficientes y luego quitada de memoria. De esta forma si se calcula hasta el orden 2 sólo hay 7 imágenes en memoria simultáneamente, un tercio de lo que se requeriría para calcular todo junto.

Matemáticamente, la imagen en el píxel  $i$  se descompone en

$$I(i, j) = c_o(i, j)[1 + \tilde{c}_1(i, j)\cos(\varphi) + \tilde{s}_1(i, j)\text{sen}(\varphi) + \tilde{c}_2(i, j)\cos(2\varphi) + \tilde{s}_2(i, j)\text{sen}(2\varphi) + R(i, j)] \quad (3.4)$$

donde en el término residual  $R(i, j)$  se incluyen todos los términos de mayor orden.

Los coeficientes se pueden escribir como:

$$\begin{aligned} \tilde{c}_n(i, j) &= \frac{2}{N_\varphi c_o(i, j)} \sum_\varphi I(i, j) \cos(n\varphi) \\ \tilde{s}_n(i, j) &= \frac{2}{N_\varphi c_o(i, j)} \sum_\varphi I(i, j) \text{sen}(n\varphi) \end{aligned} \quad (3.5)$$

con

$$c_o(i, j) = \frac{1}{N_\varphi} \sum_\varphi I(i, j)$$

y la desviación estándar da cuenta de la dispersión del término residual

$$\sigma(i, j)^2 = \frac{1}{N_\varphi} \sum_\varphi (I(i, j) - \bar{I}(i, j))^2 = \frac{1}{N_\varphi} \sum_\varphi (R(i, j) - \bar{R}(i, j))^2 \quad (3.6)$$

---

<sup>1</sup> Dado que todos los números de la imagen son reales, la información correspondiente a la parte negativa del espectro está contenida en la parte positiva. Esto reduciría el tamaño de la transformada de la secuencia a 480 Mb.

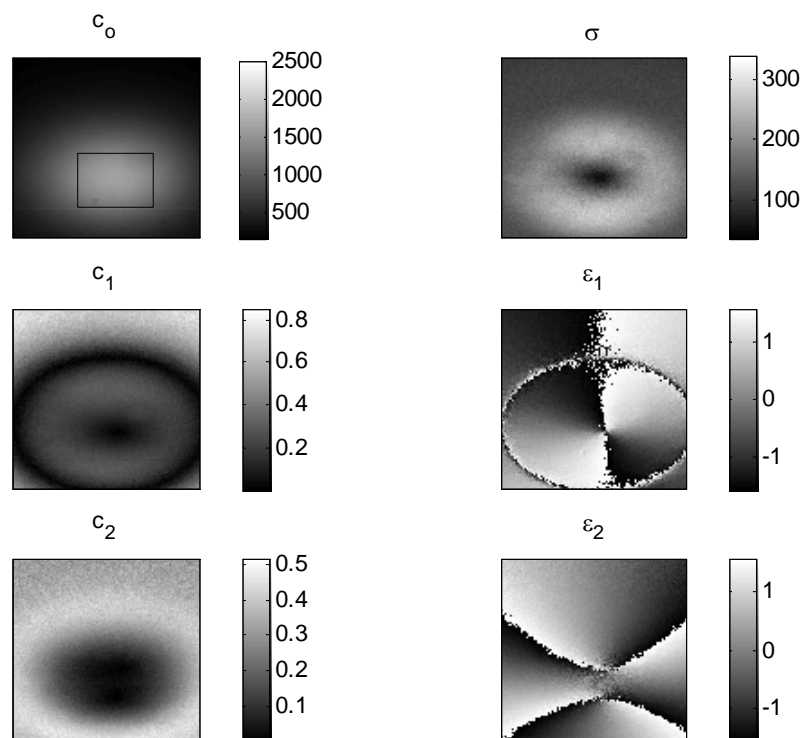
De  $s_n$  y  $c_n$  se pueden obtener la amplitud y fase de cada armónico

$$c_n(i, j) = \sqrt{\tilde{c}_n(i, j)^2 + \tilde{s}_n(i, j)^2}$$

$$\tan(\varepsilon_n(i, j)) = \frac{\tilde{s}_n(i, j)}{\tilde{c}_n(i, j)} \quad (3.7)$$

El término  $c_2(i, j)$  es la anisotropía definida en el capítulo anterior asociada en el dímero a la distancia interpartícula y  $\varepsilon_2(i, j)$  es el ángulo que subtiende su eje con el de referencia.

El análisis expuesto se implementó en Matlab. En la **Figura 3-13**, junto con el valor medio y la desviación estándar, se muestran los resultados para  $n = 1$  y 2 de amplitud y fase. Se observa, como se mencionó anteriormente, que existe una zona central de la imagen donde el campo es homogéneo.

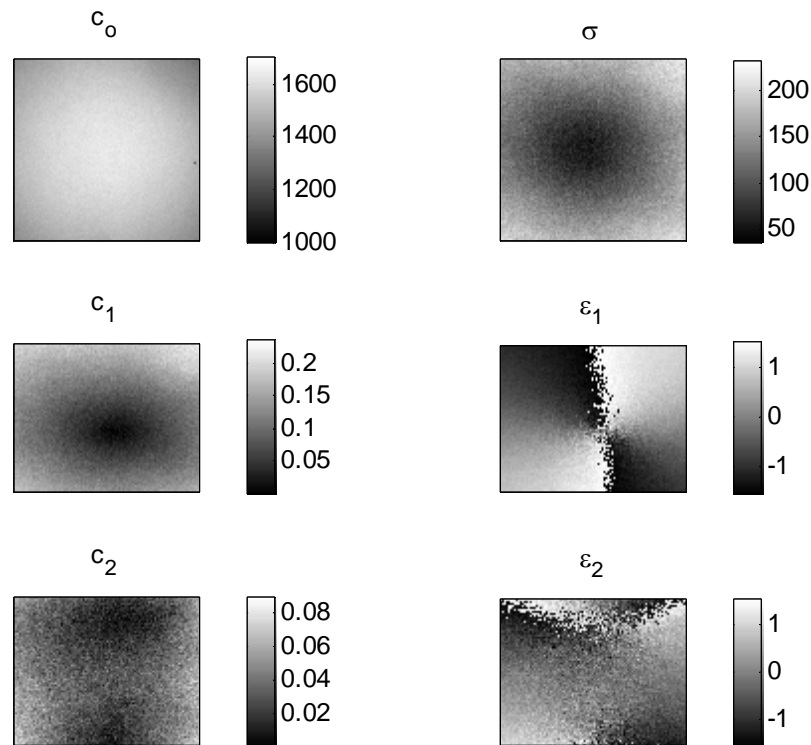


**Figura 3-13. Anisotropía intrínseca.** Medida con una muestra de Rodamina 101 en solución, que responde igual a todas las polarizaciones. (ver texto para la definición de los coeficientes). Las imágenes son de 250 x 180  $\mu\text{m}$ .

En **Figura 3-14** se muestra ampliada la región marcada con un recuadro en la figura anterior. Ésta constituye el área útil de la secuencia de imágenes y en ella la componente de 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> armónica son menores al 10% y al 1% respectivamente.



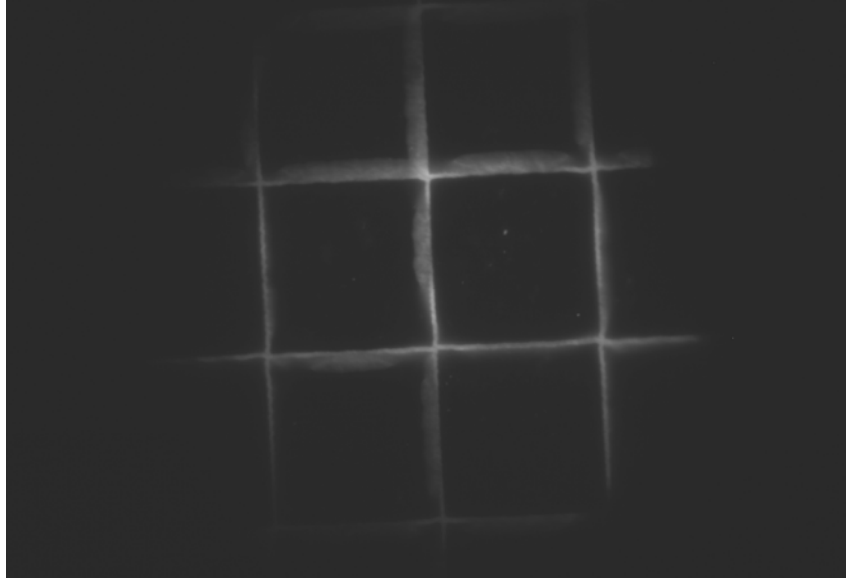
Es importante destacar que la anisotropía intrínseca de segundo orden es diez veces menor que la esperada en condiciones ideales para dímeros fabricados con partículas de 20 nm.



**Figura 3-14. Anisotropía intrínseca del sistema en la región de interés.** Se observa que la anisotropía intrínseca del sistema a segundo orden es 10 veces más chica que la esperada para los dímeros que se van a utilizar (ver texto para la definición de los coeficientes). Las imágenes son de  $45 \times 45 \mu\text{m}$ .

El proceso de alineación y calibración debe hacerse cada vez que se modifica algún parámetro de la óptica del sistema. La calidad del resultado no siempre es la misma, pero es importante destacar que conociendo la respuesta del sistema es posible incorporarla en los análisis de los datos. Como se verá en el capítulo siguiente, es necesario también realizar la misma calibración con una muestra de referencia (vidrio limpio sin nanopartículas) para caracterizar las reflexiones parasitas del láser que no fueron tenidas en cuenta aquí por colectarse la fluorescencia.

Para calibrar la magnificación del sistema se utilizó una grilla fabricada por microlitografía fluorescente.<sup>1</sup> (**Figura 3-15**) El área total iluminada es aproximadamente  $100 \times 100 \mu\text{m}$ , mientras que el área útil es aproximadamente  $50 \times 50 \mu\text{m}$ .



**Figura 3-15. Campo visual del microscopio.** Utilizando una grilla fluorescente de  $50 \times 50 \mu\text{m}$  se calibró la magnificación del sistema.

---

<sup>1</sup> Costantino 2005, Kunik 2006

*En este capítulo se presenta la forma en que fue preparada la muestra y en la que se realizó la adquisición. Luego se muestran las imágenes y se exponen los métodos para identificar en ellas las nanopartículas. Finalmente se dan los valores obtenidos para los dímeros, se discute las incertezas asociados a ellos y se muestra el ajuste con la teoría.*

## **4. Adquisición, Resultados y Análisis**

### **4.1. Preparación de las muestras**

En un recipiente de vidrio limpio se sonicaron cubreobjetos y portaobjetos en agua bidestilada a 50° durante 20 minutos. Luego de lavar 5 veces con agua bidestilada, se repitió la sonicación a 50° durante 20 minutos en agua con detergente. Se lavó 5 veces con agua bidestilada y luego 5 veces con agua MiliQ. A continuación, trabajando en un flujo laminar, se los sumergió en 5" en HFl 5%, luego 5" en una solución de bicarbonato de sodio filtrado<sup>1</sup> y finalmente 5" en acetona nivel analítico. Se deja secar y almacena hasta su uso en una cámara con una sobrepresión de nitrógeno.

Sobre el cubre objeto se armó un cámara de Parafilm. Durante 15' se incubó albúmina de suero bovino (BSA<sup>2</sup>) en PBS<sup>3</sup> filtrado. Se lavó con PBS filtrado y se dejó incubar 30' un complejo de fluoresceína-estreptavidina en PBS (50 µg/ml). Se lavó nuevamente con PBS filtrado. Los complejos de fluoresceína-estreptavidina quedan adsorbidas a la superficie del vidrio.

---

<sup>1</sup> Todas las soluciones, donde se indique, fueron filtradas con Anotop 10 cuyos poros son de 20 nm. Whatman plc. Brentford, Middlesex (Inglaterra)

<sup>2</sup> Del inglés Bovine Serum Albumina

<sup>3</sup> Buffer basado en fosfato con PH 7,4. Del inglés phosphate buffered saline.

Una vez hecho esto, se dejó incubar durante 15' una solución de partículas de oro conjugadas a biotina<sup>1</sup> de diámetro nominal 40 nm. Se lavó con abundante PBS y se incubó durante 15' una solución de partículas de oro conjugadas a estreptavidina<sup>2</sup> del mismo diámetro nominal. La concentración de esta última se eligió empíricamente de forma tal de minimizar la cantidad trómeros, tetrómeros, etc. Se lavó con abundante PBS, se secó con nitrógeno y se tapó con un portaobjeto. Se espera que en la superficie haya mayoría de monómeros, dímeros en menor proporción y algunos aglomerados mayores. Mientras que algunos aglomerados estarán formados sólo por partículas con biotina cercanas pegadas al sustrato; otras estarán constituidos por partículas pegadas entre si debido a la interacción estreptavidina-biotina. En estos últimos la separación entre las superficies de las partículas será el tamaño del complejo<sup>3</sup>, aproximadamente 10 nm.

A modo de control se preparó también una muestra sin oro.

## **4.2. Adquisición**

Iluminando por transmisión se pone en foco la muestra utilizando como referencia alguna imperfección de la misma. Se tapa la platina para evitar el ingreso de luz ambiente, se enciende el láser y se lo posiciona en un ángulo superior al crítico. Se ajusta la potencia de iluminación y el tiempo de integración para no saturar la cámara. Como se indicó en el capítulo anterior, se mueve en forma discreta el punto de enfoque en el BFP sobre un círculo imaginario con centro en el eje. Para cada posición se toma una imagen, resultando entre 10 y 20 por vuelta. El número se elige en función del ruido del sistema. Este procedimiento se repite para muchos campos visuales. Con una muestra de referencia sin nanopartículas se realiza el mismo procedimiento con el fin de obtener una caracterización del ruido de fondo.

Este procedimiento se repite para las distintas longitudes de onda

---

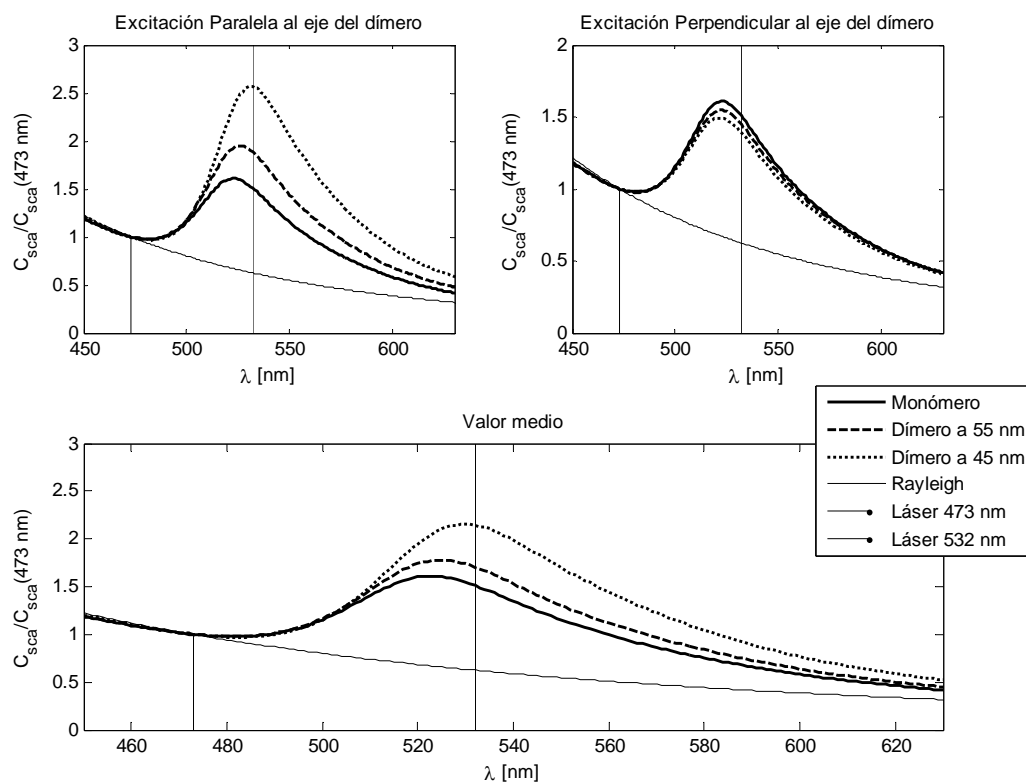
<sup>1</sup> GB-01-40. EY Laboratories. San Mateo, California (USA)

<sup>2</sup> GA-01-40. EY Laboratories. San Mateo, California (USA)

<sup>3</sup> Weber 1987

### 4.3. Análisis de las imágenes

En la **Figura 4-1** se muestra el espectro de una nanopartícula superpuesta con dos líneas verticales que indican las longitudes de onda utilizadas. El Scattering del fondo decae monótonamente como  $\lambda^{-4}$  (Rayleigh), mientras que el espectro de las nanopartículas presenta una resonancia de plasmón. Como se mencionó brevemente en la introducción, ésta es una propiedad que permite distinguir el oro del fondo. Dividendo la imagen obtenida a 532 nm por la obtenida a 473 nm, aquellos píxeles que contengan nanopartículas deberán tomar valores mayores que cierto umbral, que para partículas menores que la longitud de onda es aproximadamente 1.4. El fondo tomará valores inferiores a la unidad. Los valores entre 1 y 1.4 serán tomados como parte del fondo y, por lo tanto, descartados.



**Figura 4-1. Uso del plasmón para identificar dímeros.** Se muestran los espectros normalizados de una partícula de 20 nm de radio (sólida gruesa) y de dímeros de las mismas partículas a 45 (punteada) y a 55 nm (rayada). La polarización de la onda incidente es paralela (izquierda arriba) o perpendicular (derecha arriba) a eje del dímero. Con líneas verticales se muestran las longitudes de onda utilizadas en los experimentos. El valor medio se muestra abajo. La resonancia del plasmón permite que, detectando en dos colores, puedan distinguirse las nanopartículas que presentan un máximo, del fondo que decrece monótonamente (sólida fina).

El mismo argumento puede aplicarse también a dímeros. Si bien el espectro difiere del correspondiente al monómero, presentará una resonancia al igual que éste. Como se ve en la figura, al ser excitado con luz linealmente polarizada en la dirección del dímero el pico se corre hacia el rojo (**Figura 4-1** arriba izquierda). Para la polarización perpendicular el corrimiento será un orden de magnitud menor y hacia el azul (**Figura 4-1** arriba derecha). El valor medio al rotar la polarización presenta un corrimiento hacia el rojo (**Figura 4-1** abajo). Se observa que lo enunciado para los monómeros sigue siendo válido: el cociente entre los valores medios del Scattering a 532 y 473 nm será mayor que un umbral para aquellos puntos que contengan oro.

Es relevante hacer una salvedad acerca de este valor umbral. Dado que en el sistema existe un fondo asociado a las reflexiones no deseadas dentro de los componentes ópticos del microscopio que se suman al Scattering de las nanopartículas, el valor se ve disminuido. Como se mencionará mas adelante, en las mediciones realizadas el fondo es cercano a 20.000 cuentas por lo que el umbral pasará de 1.4 a 1.06. Por este motivo es conveniente elegirlo en cada caso según las condiciones del experimento.

Una vez tomadas las secuencias se procede el análisis de las imágenes. En primer lugar, se subtrae de cada una un valor constante correspondiente a las cuentas de oscuridad que se mide tomando una imagen de la misma duración con el obturador de la cámara cerrado.

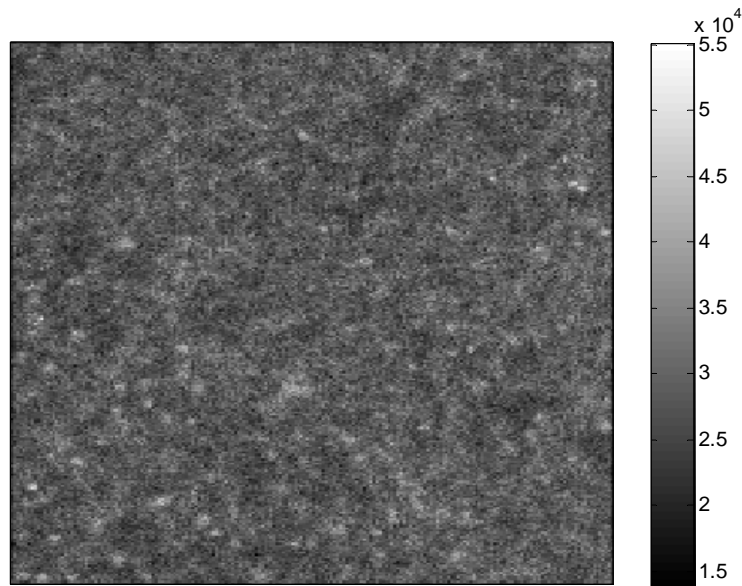
Para caracterizar el fondo se realiza un análisis estadístico de las imágenes obtenidas para la muestra sin nanopartículas, obteniéndose  $(20 \pm 3) 10^3$  cuentas.

A continuación la secuencia es analizada con el procedimiento descrito en el capítulo anterior para obtener los coeficientes del contenido armónico de la secuencia. Éstos son renormalizados por la intensidad del láser medida después del objetivo. Se obtienen así para cada secuencia de imágenes 6 coeficientes por longitud de onda utilizada.

Finalmente se realiza el cociente cromático. El procedimiento se realiza en este orden para aprovechar la información codificada en cada color. El valor medio y la anisotropía difieren no sólo a causa de la longitud de onda, sino también por el acople como se muestra en el gráfico anterior. La relación entre el cociente cromático de intensidades medias y de anisotropía se perdería de realizar en primer lugar el análisis armónico.

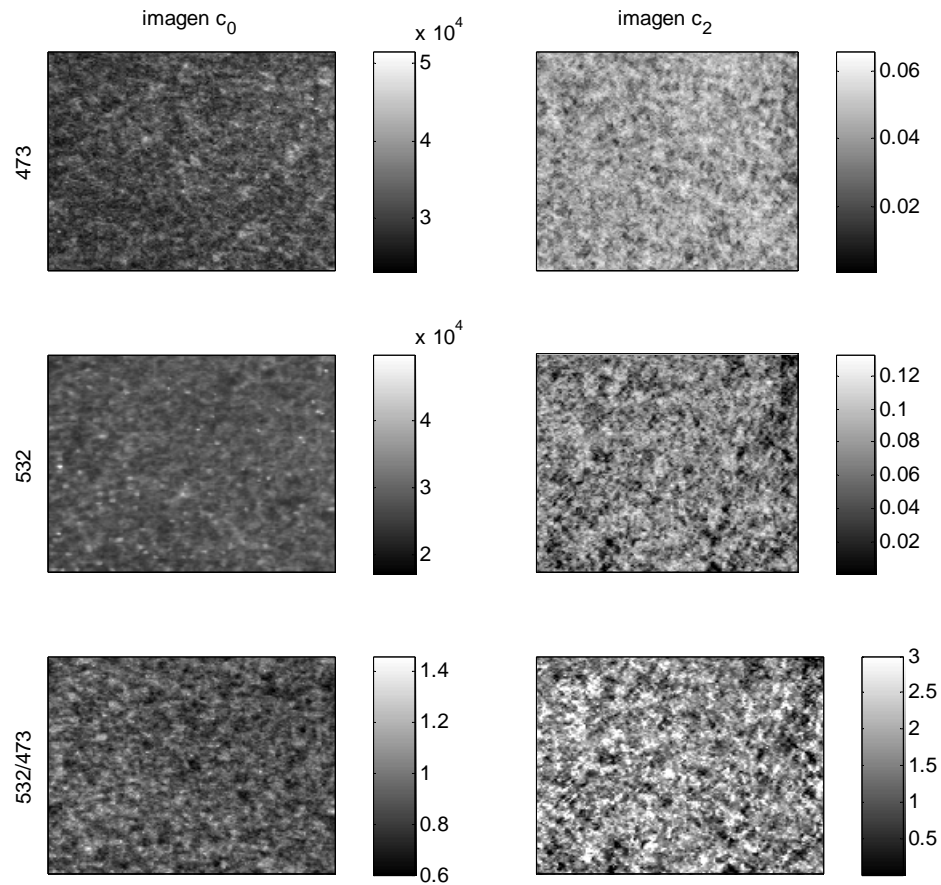
#### 4.4. Resultados

En la **Figura 4-2** se muestra una típica imagen obtenida en una muestra con nanopartículas de oro. Por la presencia del fondo estructurado proveniente de múltiples reflexiones del haz de excitación, las nanopartículas no son fácilmente distinguibles.



**Figura 4-2. Imagen de nanopartículas de oro depositadas sobre vidrio.** En configuración de RTI se incide sobre la muestra y se detecta el Scattering de la misma con una cámara a través del objetivo. La imagen contiene luz proveniente de las nanopartículas, sino también y fundamentalmente de reflexiones espurias que no pueden ser filtradas como en la microscopía de fluorescencia.

De las imágenes obtenidas para cada ángulo y para cada longitud de onda se realiza el análisis armónico mencionado. En **Figura 4-3**, se muestran el valor medio y la anisotropía ( $c_0$  y  $c_2$ ) en la primera y segunda columna, usando excitación a 473 nm en la primera fila, 532 nm (segunda), y el cociente (tercera).

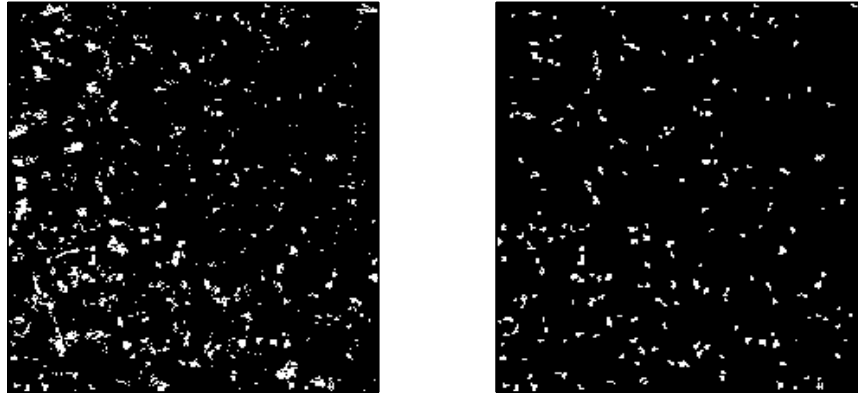


**Figura 4-3. Análisis armónico de las imágenes.** La columna izquierda corresponde a  $c_0$  y la derecha a  $c_2$ . Las dos primeras filas muestran las imágenes obtenidas excitando a con  $\lambda = 473$  nm y con  $\lambda = 532$  nm respectivamente. En la tercera fila se muestra el cociente entre ambas longitudes de onda.

En el cociente entre los valores medios se observa que hay píxeles cuya señal a 532 nm es superior a su señal a 473 nm, mientras que en otros ocurre lo opuesto. Por lo mencionado anteriormente, los primeros son posibles nanopartículas de oro.

Utilizando 1.04 como valor umbral se conservan sólo aquellos píxeles que lo superan (**Figura 4-4 izquierda**). De estos se realiza un análisis por conectividad a primeros vecinos y se agrupan las regiones conexas conservando sólo aquellas con tamaños entre 3 y 15 píxeles. (**Figura 4-4 derecha**)





**Figura 4-4. Análisis por umbral y conectividad.** (izquierda) En blanco se muestran aquellos píxeles que superan el valor umbral. Utilizando conectividad a primeros vecinos, se conservan las regiones conexas con tamaños entre 3 y 15 píxeles y se descartan las otras. (derecha) En blanco se muestran los píxeles conservados.

En principio sería posible realizar la detección de las nanopartículas utilizando únicamente las imágenes obtenidas a 532 nm. Sin embargo se observa que los puntos recuperados de esta forma difieren de los obtenidos con el método diferencial. Cuando se usa una sola longitud de onda se observa que se recuperan puntos descartados por el método diferencial (falsos positivos). Ocurre también lo inverso ya que puntos descartados a 532 nm son recuperados cuando se usa el cociente (falsos negativos). Este hecho muestra la utilidad de la técnica de detección diferencial y prueba que, aunque el espectro provee más información, dos longitudes de onda son suficientes para mejorar la detección de nanopartículas.

Para cada región se calcula la media y la desviación estándar para todos los coeficientes  $c_n$ . Si todos los puntos de una región provienen de un único cúmulo, se espera que la dispersión de  $c_n$  sea pequeña, razón por la cual se descartan aquellas regiones donde esto no se cumple. Al final de este proceso de selección se contabilizan 6200 regiones, pudiendo cada una ser un monómero, dímero, trímero, etc. Teniendo en cuenta que de 3 muestras diferentes se tomaron un total de 30 campos visuales<sup>1</sup>, la densidad media de aglomerados es levemente superior a  $0.1/\mu\text{m}^2$ .

---

<sup>1</sup> Se quitaron de la estadística aquellos campos visuales que, en las mismas condiciones de iluminación y detección que el resto, presentaban numerosos puntos que saturaban la cámara.

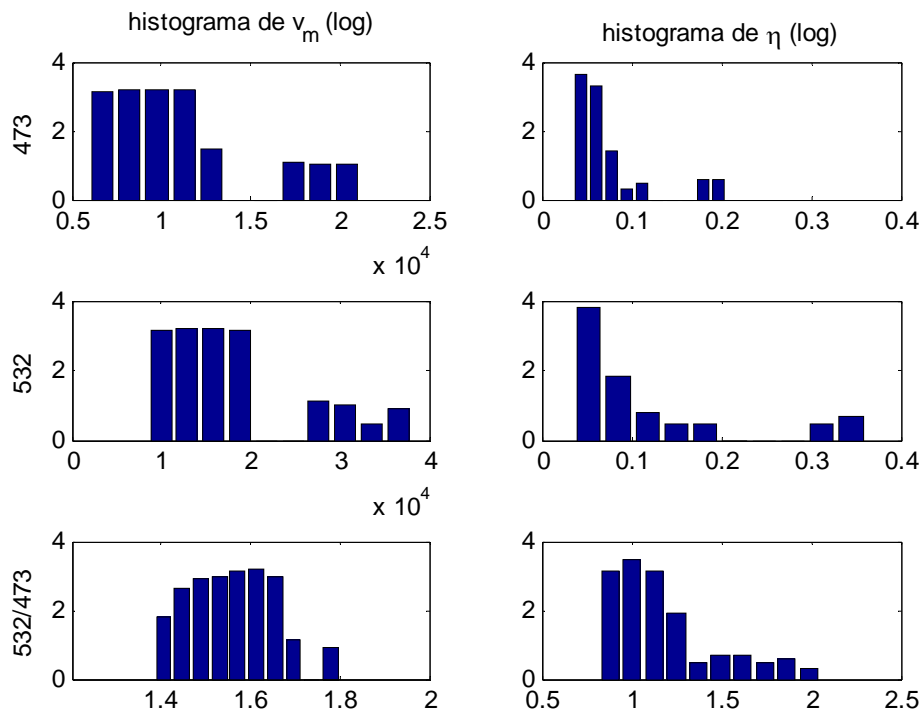
Por la existencia del fondo, los valores de los coeficientes medidos no son los definidos como valor medio y anisotropía en el capítulo 2. El valor medio  $c_0$  es mayor y la anisotropía  $c_2$  menor que los teóricos. Usando el valor del fondo medido es posible corregir obtener el valor medio  $v_m$  según

$$v_m = c_0 - I_{fondo} \quad (4.1)$$

y la anisotropía  $\eta$  según

$$\eta = c_2 \left( 1 + \frac{I_{fondo}}{v_m} \right) \quad (4.2)$$

Se realizaron histogramas en escala logarítmica de los valores resultantes. En la **Figura 4-5** (columna izquierda) se analiza para ambas longitudes (primeras dos filas) de onda el valor medio ( $v_m$ ). Se observa que los valores a 532 nm son superiores a los que se obtienen a 473 nm, como se espera por la resonancia del plasmon. Para ambas longitudes de onda existen un gran número de cuentas para los valores inferiores. Estos valores son compatibles el número de cuentas esperado para una partícula de 20 nm de radio en las condiciones de iluminación y detección que se utilizaron (aprox. 10.000 a 532 nm). Se observa también un pico cercano a las 20.000 cuentas que corresponde a la presencia de dímeros, ya que por el acople su sección eficaz de Scattering es mayor.



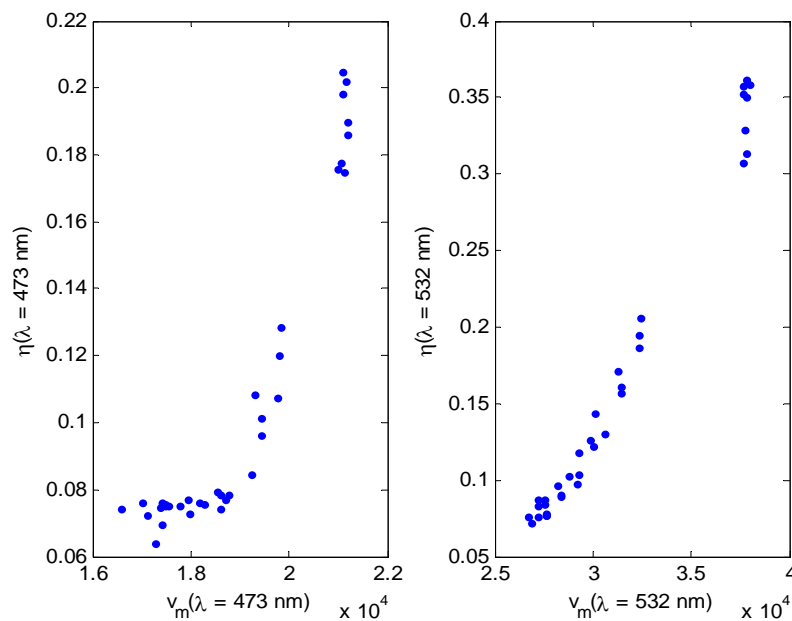
**Figura 4-5. Histogramas del valor medio y la anisotropía.** Notar que la escala en el eje de las ordenadas es logarítmica. Sólo se muestran los valores para aquellos puntos de las imágenes que tienen las características del oro (ver texto). La columna izquierda corresponde a  $v_m$  y la derecha a  $\eta$ . Las dos primeras filas muestran los histogramas excitando con  $\lambda = 473$  nm y con  $\lambda = 532$  nm respectivamente. En la tercera fila se muestra el cociente.

Los histogramas de la derecha muestran la distribución de la anisotropía. Nuevamente se observa que abundan las anisotropías cercanas al valor intrínseco medido en el capítulo anterior que corresponden a partículas aisladas. Existen sin embargo algunos valores que son significativamente diferentes. E y que corresponden a dímeros.

En la tercera fila se muestra la distribución de  $v_m$  y  $\eta$  del cociente entre ambas longitudes de onda. Se observa en ambos casos que el rango en el que se expanden el valor medio y la anisotropía disminuye considerablemente al hacer el promedio. Para el valor medio, el cociente entre el valor máximo y mínimo pasa de 1,4 tomando las longitudes de onda por separado, a 1,15 si se usa el cociente. Para la anisotropía pasa de 4,3 a 2,1. Este hecho será importante al discutir la mejor forma de ajustar los datos experimentales.

Para estudiar en mayor profundidad la respuesta de los dímeros se seleccionan únicamente aquellos puntos que presentan anisotropía alta,

contabilizándose un total de 35. De lo anterior puede calcular que la abundancia relativa de dímeros es menor al 1%. En la **Figura 4-6** se grafica  $\eta$  vs.  $\nu_m$  a ambas longitudes de onda. Se corrobora lo inferido en párrafos anteriores: las anisotropías altas se corresponden con los valores medios altos. Se observa también que a 473 nm existe un *plateau*, posiblemente a causa del predominio de la anisotropía intrínseca del dispositivo experimental.



**Figura 4-6. Relación entre anisotropía y valor medio.** (izquierda)  $\lambda = 473 \text{ nm}$  . (derecha)  $\lambda = 532 \text{ nm}$ . Se observa que existe una correlación entre ambos coeficientes. A valores bajos de anisotropía le corresponden valores medios bajos. A 473 nm se observa un *plateau*, posiblemente a causa de que domina la anisotropía intrínseca del sistema.

Una vez obtenidas las anisotropías es preciso pasar por la teoría expuesta previamente para calcular la distancia que cada valor representa. El campo incidente que debe usarse para calcular las secciones involucradas es una onda evanescente generada por una de polarización circular que incide sobre una interfase. Su expansión en armónicos esféricos vectoriales se encuentra en la literatura.<sup>1</sup> Sin embargo para partículas con radios menores a los 100 nm como las que se utilizan en esta tesis, se puede mostrar que la respuesta no difiere

<sup>1</sup> Chew 1979

significativamente a la de una onda plana.<sup>1</sup> Los valores de  $E_x$  y  $E_y$  se calculan usando las expresiones dadas en el capítulo 3. La polarización resultante es elíptica y la excentricidad será mayor cuanto más cercano sea el ángulo  $\theta_{inc}$  al ángulo crítico. Este hecho producirá una reducción de la anisotropía efectiva. Para discutir la contribución del dipolo generado en la dirección  $z$  debe tenerse en cuenta que:

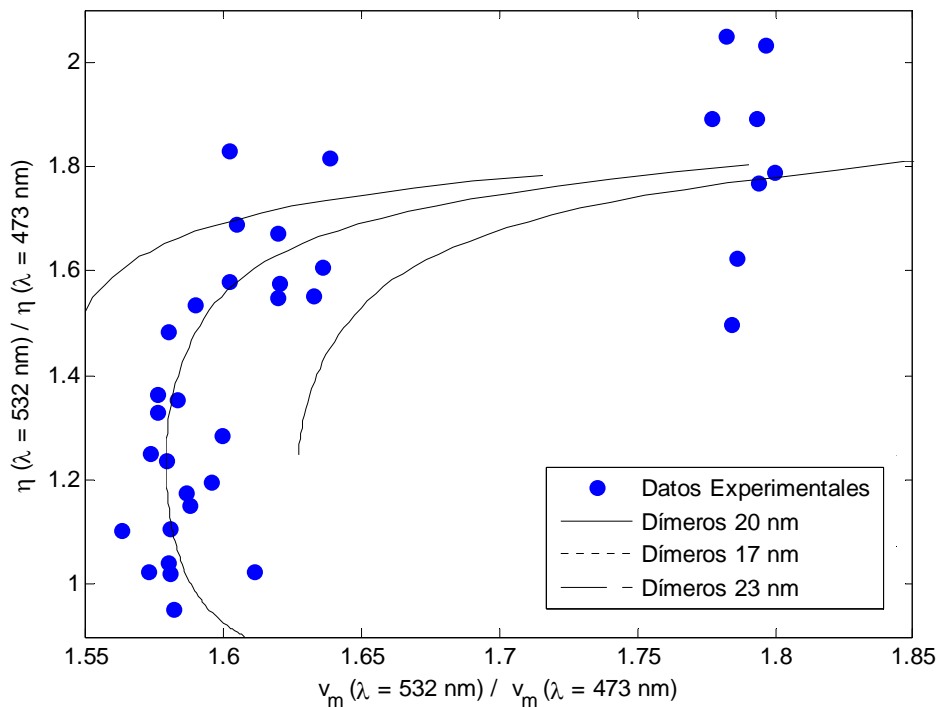
- La componente  $E_z$  es varias veces menor que  $E_x$  y  $E_y$  para el ángulo  $\theta_{inc}$  utilizado.
- Por ser colineal con el eje del objetivo, la eficiencia de colección del Scattering producido por esta componente del dipolo inducido es significativamente menor que la de las otras componentes.

Estos dos hechos combinados hacen que pueda despreciarse la contribución de este dipolo.

A continuación (**Figura 4-7**) se muestran los resultados experimentales corregidos según (4.1) y (4.2) , superpuestos con los resultados del modelo de GMMie para dímeros de oro de 20 nm de radio y separaciones entre 50 y 120 nm. También se muestran curvas con dímeros de oro de 17 y 23 nm. Al dividir el resultado de una longitud de onda sobre la otra se cancelan en el valor medio los factores propios del microscopio. Se observa que la tendencia del modelo coincide con los datos experimentales. La distancia mínima es aproximadamente 55 nm que coincide en orden de magnitud con dos partículas de radio 20 nm separadas por un complejo estreptavidina-biotina.

---

<sup>1</sup> Quinten 1999, Wannemacher 1999



**Figura 4-7. Datos experimentales vs. cálculos teóricos.** Los valores calculados fueron obtenidos utilizando el tamaño nominal de las partículas (radio 20 nm). También se muestran curvas para dímeros compuestos por partículas menores (17 nm) y mayores.

El resultado anterior muestra que los datos experimentales tienen la tendencia apropiada. Mediante un ajuste más fino es posible obtener para cada uno de los puntos los 4 parámetros que caracterizan al dímero: radios de ambas partículas (que pueden diferir), distancia entre ellas, orientación en el plano. Sin embargo, para realizar esto es necesario estimar primero las incertezas experimentales.

#### 4.5. Incertezas experimentales

Como se mencionó en el capítulo 3, se puso especial esfuerzo en asegurar la circularidad de la polarización antes del objetivo y la homogeneidad de la iluminación a través de un correcto posicionamiento de los haces. Las anisotropías intrínsecas reportadas previamente muestran que la incerteza asociada a la variación de la intensidad durante el giro es despreciable.

El factor más importante en la incerteza experimental es el fondo, proveniente de reflexiones parásitas en el interior del microscopio. Por la alta coherencia de la fuente de luz utilizada, éstas generan patrones de interferencia que

varían punto a punto. Estos dependen del ángulo de incidencia del haz sobre la muestra y tienen simetría  $2\pi$ . La rugosidad del cubreobjeto, así como la distancia entre éste y el objetivo, modifican también los patrones generados. Dado que la profundidad de campo en objetivo de NA 1.45 es una fracción de la longitud de onda, no es posible garantizar que poniendo en foco la superficie del cubreobjeto se obtendrá siempre el mismo patrón. Esto hace imposible realizar una sustracción del fondo interferométrico, sólo siendo posible la quita de las ya mencionadas cuentas de oscuridad. A pesar de esto es posible detectar los dímeros dado que se realiza una detección de puntos con una simetría particular (diferente a la del fondo) asistida por una dependencia específica con la longitud de onda (también diferente a la del fondo).

Se procederá ahora a discutir las incertezas asociadas a la detección armónica. Se puede estudiar numéricamente la dispersión de la anisotropía, del ángulo y del valor medio en presencia de ruido. Supongamos que el número de cuentas de un píxel determinado podemos escribirla como

$$N(\varphi) = c_o(1 + b \cos(\varphi + \varepsilon_1) + c_2 \cos(2\varphi + \varepsilon_2) + R) \quad (4.3)$$

con  $c_o$ ,  $c_2$ ,  $\varepsilon_2$  los valores que se desea recuperar.  $b$ ,  $\varepsilon_1$  y  $R$  son variables aleatorias que dan cuenta del fondo del sistema.<sup>1</sup> Las magnitudes  $b$  y  $R$  toman un valor distinto para cada ángulo con distribuciones normales centradas en  $m_b$  y  $m_R$  y con dispersión  $\sigma_b$  y  $\sigma_R$  respectivamente, cuyos valores se elijen por inspección de las imágenes. Se genera un barrido uniforme<sup>2</sup> en  $\varphi$  de 20 pasos entre 0 y  $2\pi$ , se calcula  $N(\varphi)$ . Utilizando las ecuaciones (3.5) se recuperan los parámetros del  $c_2$ ,  $\varepsilon_2$  y  $c_o$  y realizando esta operación muchas veces puede “medirse” su dispersión.

Para los valores utilizados para las variables estadísticas<sup>3</sup> los resultados numéricos indican que no hay corrimientos sistemáticos entre el valor recuperado y el utilizado para simular. La dispersión recuperada del valor medio es 2%, de la anisotropía 7% y del ángulo 90 mrad que equivalen a aproximadamente 5°. Tomando mayor número de ángulos, pueden ser disminuidos.

---

<sup>1</sup> Para este análisis no se incluye el ruido de conteo ya que para  $N \sim 20.000$ , el error relativo es menor al 1%, y para más cuentas es aún menor.

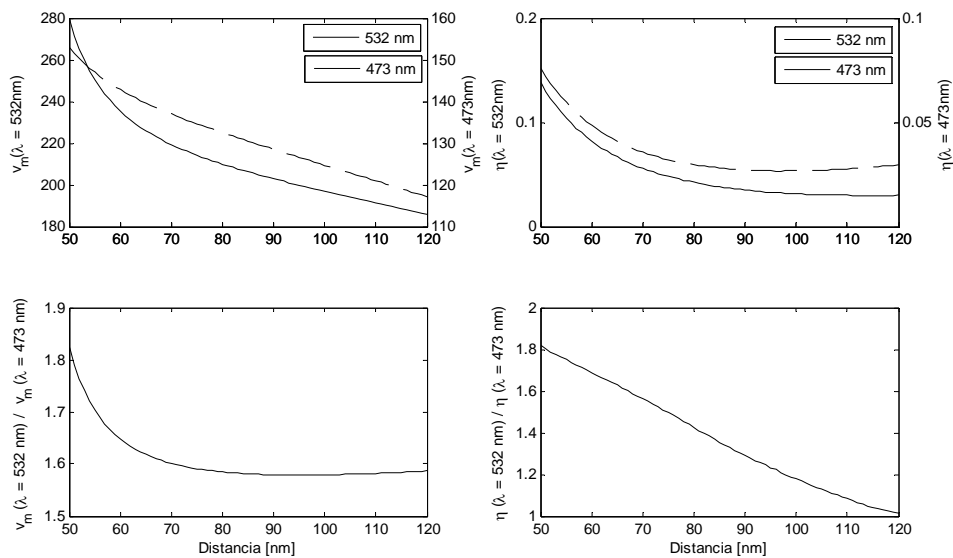
<sup>2</sup> La uniformidad del barrido en el experimento está garantizada por la precisión de la alineación y la calibración. La incerteza en estos parámetros es despreciable.

<sup>3</sup>  $m_b = 0,4$ ,  $\sigma_b = 0,3$ ;  $m_R = 0$ ,  $\sigma_R = 0,5$

En el cálculo anterior se supuso un fondo aleatorio y se mostró que lograba recuperar los valores simulados con las dispersiones mencionadas. Sin embargo se debe corregir estos valores usando las ecuaciones de (4.1) y (4.2) para poder comparar con el modelo. Como se mencionó anteriormente este valor de fondo no es homogéneo; y se utiliza un valor promedio para corregir que está asociado a una desviación. Ésta es la principal fuente de incerteza para el valor medio, cuyo valor aumenta al 15%.<sup>1</sup> La de la anisotropía no cambia significativamente y llega al 8%. Es importante notar que esto **no** afecta la incerteza angular, que sólo depende de la calidad de la detección armónica.

#### 4.6. Ajuste

Para cada punto, los datos experimentales son cuatro:  $v_m(473 \text{ nm})$ ,  $\eta(473 \text{ nm})$ ,  $v_m(532 \text{ nm})$  y  $\eta(532 \text{ nm})$ . En la **Figura 4-8** se muestran nuevamente las predicciones para los valores de estos coeficientes y de los cocientes cromáticos.



**Figura 4-8. Rango dinámico de las variables de ajuste.** Tomando en forma separada las predicciones para partículas de 20 nm de radio para las distintas longitudes de onda (arriba) valores medio (izquierda) y anisotropía (derecha), se obtiene un rango dinámico mayor al que se obtiene si se realiza el cociente (abajo). Sin embargo, para los valores medios, en el cociente se cancelan los factores de de calibración que son difíciles de obtener en forma absoluta con la precisión requerida.

<sup>1</sup> La incerteza en cada caso es diferente porque depende del valor medido. Se informa un orden de magnitud para realizar la discusión.



Teniendo en cuenta que el error relativo del cociente es la suma de los errores relativos y de la escala de las ordenadas; se observa que para el cociente, la incerteza es una mayor proporción del rango total, como se había resaltado previamente para los datos experimentales. De esto se concluye que es mejor utilizar los valores por separado para realizar un ajuste.

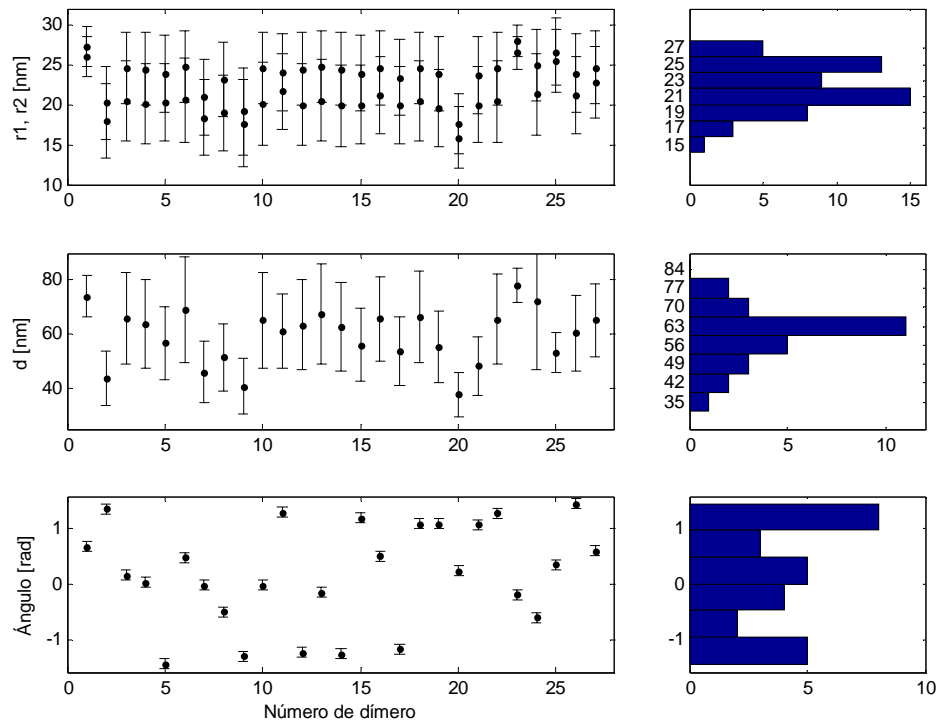
El uso del cociente de anisotropías es conveniente por que es prácticamente insensible al ángulo  $\theta_{inc}$ . Sin embargo su uso por separado no representa problema alguno ya que es un valor absoluto adimensional que se puede calcular dado que se cuenta con una calibración fiable de los galvanómetros.

En el caso de los valores medios sería menester contar con un factor de calibración que convierta de número de cuentas a sección eficaz. En este factor entran en juego, entre otros, las eficiencias de colección, transmisión y detección del sistema; que si bien pueden ser estimados para tener un orden de magnitud del número de cuentas esperado, por su incerteza no puede usarse para realizar la conversión. Como forma de calibración *in situ* se pensó inicialmente en normalizar con la intensidad de los monómeros como fuera expuesto en el capítulo 2. Sin embargo, el alto nivel de fondo hace esto imposible.

Por lo expuesto previamente y dado que en el cociente de los valores medios el factor de conversión se compensa, se decidió ajustar los tres parámetros (radios de ambas partículas, distancia entre ellas) usando sólo tres mediciones:  $\eta(473 \text{ nm})$ ,  $\eta(532 \text{ nm})$  y  $\nu_m(532 \text{ nm})/\nu_m(473 \text{ nm})$ . El ángulo se obtendrá de promediar los recuperados para cada longitud de onda.

En primer lugar, usando el modelo dipolar se varían los 4 parámetros conjuntamente para encontrar en que configuraciones se satisfacen que  $\eta(473 \text{ nm})$  calculada está dentro de la incerteza del valor medido. Estas configuraciones se refinan luego usando la teoría GMMie. El proceso se repite para  $\eta(532 \text{ nm})$  y  $\nu_m(532 \text{ nm})/\nu_m(473 \text{ nm})$ , obteniéndose así 3 grupos de configuraciones. Las que estén en la intersección de estos grupos serán aquellas que satisfagan las tres condiciones. Se calcula el valor medio de cada uno de los parámetros haciendo un promedio de las configuraciones ponderadas por la inversa de la diferencia entre el experimental y el teórico para esa configuración. Este proceso se repite para cada uno de los dímeros.

De los 35 dímeros identificados originalmente, 27 pudieron ser ajustados con el procedimiento descrito en la **Figura 4-9**. En la siguiente sección se discute acerca de estos resultados así como también de los ocho puntos que no pudieron ajustarse.



**Figura 4-9. Resultados del ajuste.** Para 27 de los 35 dímeros se pudo encontrar configuraciones que satisfagan las mediciones de anisotropía a las distintas longitudes de onda y del cociente de valores medios. Se muestra para cada uno de los dímeros (arriba) los radios de las partículas, (centro) la distancia entre ellas y (abajo) el ángulo del dímero. A la derecha de cada gráfico se muestran los histogramas para cada variable.

#### 4.7. Discusión

En primer lugar se observa que el radio medido de las partículas es cercano a 23 nm, superior al valor nominal (20 nm) especificado por el fabricante. Asimismo, la dispersión de esta variable es muy superior a lo especificado. Se advierte también que la incerteza en la determinación experimental de los radios de las partículas es relativamente alta.

Para la distancia entre las partículas se presenta un pico entre 60 y 66 nm, observándose también distancias mayores y menores. La máxima distancia medida

fue de 77 nm y la mínima de 37 nm. Si se realiza el cociente para cada dímero entre la distancia y el promedio de los radios, se obtienen valores entre 2 y 3. En analogía con los resultados para homodímeros obtenidos en el capítulo 2 se observa que este es el rango de mayor sensibilidad de la técnica. La incerteza en la determinación de la distancia podría reducirse drásticamente si se utilizaran partículas realmente monodispersas ya que se reduciría el número de configuraciones compatibles con los valores medidos.

Finalmente, la alineación de los dímeros se observa un histograma compatible con una distribución uniforme, para el número de puntos medidos. La incerteza en esta medición es ligeramente superior a los 5° y surge de combinar las incertezas propia de la recuperación con la dispersión entre ambas longitudes de onda (que es mucho menor).

Los ocho puntos que no pudieron ser ajustados están concentrados en la región superior derecha de la **Figura 4-7**. Si bien el cociente de anisotropías presenta valores consistentes con el cociente de valores medios, los valores de  $\eta$  por separado son superiores a lo esperado. Se intentaron distintos arreglos de partículas para poder ajustar estos datos experimentales sin obtenerse resultados satisfactorios. Se requerirán futuros estudios para poder determinar el origen de estos puntos anómalos.

*En este capítulo se dan las conclusiones de la tesis y se enumeran sus principales aportes. En función de los resultados se discuten diversas formas de mejorar la técnica y la vinculación de éstas con las líneas actualmente activas en el laboratorio.*

## **5. Conclusiones**

En la presente tesis se propuso e implementó una técnica que permite caracterizar un dímero compuesto por nanopartículas metálicas, midiendo su orientación en el plano y la distancia entre las partículas que la componen. Dado que está basado en una propiedad intrínseca, como es la respuesta electromagnética, no es preciso resolver las partículas individualmente.

Se mostró teóricamente que en la señal de Scattering en función de la polarización está codificada la información de la distancia y orientación de un dímero formado por nanopartículas.

Se modificó un microscopio de reflexión total interna para poder rotar la polarización en el plano de la muestra. Se mostró que la transmisión selectiva que brinda la RTI permite simplificar el diseño de forma tal que basta con incidir en la interfase con una onda circularmente polarizada.

Se demostró que para identificar nanopartículas basta con dos longitudes de onda elegidas de forma tal que coincidan con el inicio y el centro de la resonancia del plasmon; siendo innecesario medir todo el espectro de Scattering de las mismas. Dada la velocidad de adquisición, esto permitiría medir distancias y orientaciones aún en procesos dinámicos. Se demostró además que esta detección diferencial disminuye la recuperación de falsos negativos y falsos positivos.

Se ilustró su aplicación en una muestra que consta de mayoría monómeros y una pequeña proporción de dímeros. Para cada uno de estos últimos se determinó los radios de cada una de las partículas así como la distancia entre sus componentes. Las separaciones interpartícula encontradas son compatibles con los parámetros de la muestra. Asimismo se midió la orientación del dímero en el plano, siendo esta una característica distintiva de la técnica.

Se mostró que es posible compensar por la presencia de un fondo del orden del Scattering de los dímeros. A pesar de esto se concluyó también que es el fondo la mayor fuente de incerteza por lo que sería conveniente trabajar en eliminarlo.

Se ha demostrado muy recientemente<sup>1</sup> una técnica basada en Scattering de nanopartículas para medir distancias en muestras biológicas que consiste en medir variaciones en el espectro. En esta tesis se ha establecido que sin medir el espectro y aprovechando la sensibilidad de un dímero a la polarización incidente es posible además de la distancia obtener su orientación. Esta última es una propiedad distintiva de la técnica aquí introducida.

### **5.1. Perspectivas**

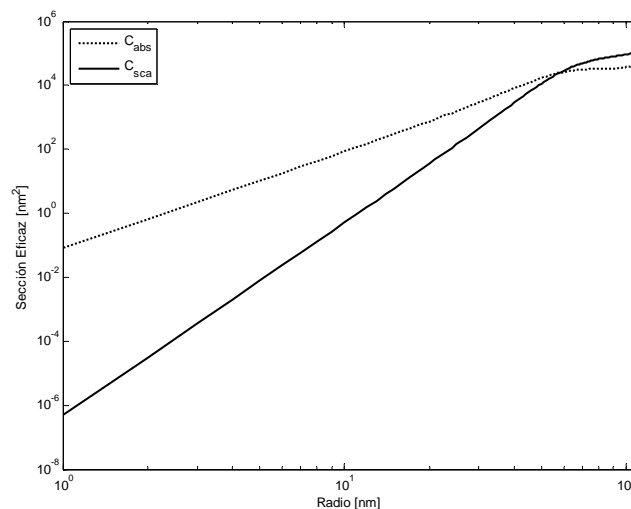
Como se mencionó en la introducción, las nanopartículas metálicas tienen ciertas ventajas respecto de las sondas fluorescentes, siendo la más importante la fotoestabilidad. La clara desventaja es la ausencia de separación entre la longitud de onda de excitación y de emisión. Durante la realización de esta tesis se han desarrollado en otros grupos de investigación diversas técnicas para poder medir partículas pequeñas cuya sección eficaz brinda una señal por debajo del nivel del ruido. A continuación se enumeran estas técnicas y se muestra que es posible combinarlas con el esquema de caracterización de dímeros presentado en este trabajo.

Esteban Domené esta realizando su tesis de licenciatura implementando una técnica fotoacústica para medir partículas en solución. Para partículas cuyos

---

<sup>1</sup> Liu 2006

con tamaños son mucho menores que la longitud de onda, la sección eficaz de Scattering va como  $\text{radio}^6$  mientras que la de Absorción sólo como  $\text{radio}^3$ . Por lo tanto, para partículas muy chicas la segunda domina sobre la primera. (**Figura 5-1**) La relación recién se invierte cuando la circunferencia de la esfera es del orden de  $\lambda$ . Queda claro que una técnica basada en detectar la absorción de ésta será más sensible y permitirá medir partículas más pequeñas.<sup>1</sup> Se han implementado métodos basados en la detección de la onda acústica generada por expansión térmica para medir la respuesta de partículas en suspensión y se han hecho algunas incursiones para aplicarlo en microscopía.<sup>2</sup> Dado que la señal medida no es óptica puede ser separada fácilmente de la excitación. La misma idea aplicada en esta tesis puede implementarse en estas técnicas dado que la sección eficaz de absorción también dependerá fuertemente de la polarización de la onda incidente.



**Figura 5-1. Sección eficaz vs. tamaño.** Se observa que la sección eficaz de absorción (punteada) es dominante para partículas pequeñas mientras que la de Scattering (sólida) es varios órdenes menor. Para partículas cuya circunferencia es del orden de la longitud de onda, se el Scattering se vuelve dominante.

Se han demostrado también técnicas basadas en excitación multifotónica<sup>3</sup> y fotoluminiscencia<sup>1</sup> de nanopartículas metálicas. La excitación se realiza con un

<sup>1</sup> Dijkstra 2006

<sup>2</sup> Boyer 2002

<sup>3</sup> Yelin 2003

láser infrarrojo pulsado (típicamente un Ti:Za) y la detección se realiza en el visible. La separación espectral facilita la detección eliminando virtualmente el fondo. Ambos procesos dependen de la intensidad local del campo y en un dímero estos dependen fuertemente de la polarización incidente. A diferencia del Scattering “lineal” expuesto en esta tesis, la teoría que vincula la relación entre la señal y la configuración del dímero presenta más parámetros cuya determinación por experimentos independientes es de difícil o imposible realización, por lo que sería imprescindible contar con muestras de calibración.

También se está desarrollando en el laboratorio una fuente de luz láser de luz blanca. Este tipo de fuentes puede conseguirse acoplando un láser de Ti:Za en una fibra de cristal fotónico.<sup>2</sup> Por efectos no lineales dentro de la fibra, se generan un espectro quasi continuo desde el visible hasta el infrarrojo. Dado su gran ancho de banda, la longitud de coherencia es muy corta eliminando la interferencia producida por reflexiones múltiples en las distintas ópticas que componen el microscopio. Asimismo, se ha mostrado también que es combinando la detección heterodina con la excitación de un láser de luz blanca es posible detectar nanopartículas y medir el espectro.<sup>3</sup>

Regulando la potencia, es posible operar el láser en un ancho de banda menor y sintonizable a alta velocidad. Esta última propiedad, junto con su brillo y su coherencia espacial permitiría tomar espectros de muestras en tiempos mucho menores a los actuales.

---

<sup>1</sup> Geddes 2003, Wang 2005

<sup>2</sup> Masip 2006

<sup>3</sup> Lindfors 2004





## Apéndice

Los armónicos esféricos vectoriales (AEV) expresados en un sistema de coordenadas con origen en  $j$  pueden expandirse en una suma de infinitos AEV con origen en  $i$ . Los coeficientes de esta expansión, denominados de translación, se calculan a partir de la siguiente expresión<sup>1</sup>

$$\begin{aligned} A_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) &= C_o e^{i(\mu-m)\phi_{j,i}} \sum_{q=0}^{q_{\max}} (-1)^q C_p a_q j_p^{(3)}(kd_{j,i}) P_p^{\mu-m}(\cos \theta_{j,i}) \\ B_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) &= C_o e^{i(\mu-m)\phi_{j,i}} \sum_{q=1}^{Q_{\max}} (-1)^{p+1} b_q j_{p+1}^{(3)}(kd_{j,i}) P_{p+1}^{\mu-m}(\cos \theta_{j,i}) \end{aligned} \quad (5.1)$$

donde se definió

$$\begin{aligned} p &= n + \nu - 2q, \\ q_{\max} &= \min[n, \nu, (n + \nu - |\mu - m|) / 2], \\ Q_{\max} &= \min[n, \nu, (n + \nu + 1 - |\mu - m|) / 2], \\ C_o &= \frac{(-1)^m}{2} \left[ \frac{n(2n+1)(2\nu+1)(n+m)!(\nu-\mu)!}{(n+1)\nu(\nu+1)(n-m)!(\nu+\mu)!} \right]^{1/2}, \\ C_p &= n(n+1) + \nu(\nu+1) - p(p+1). \end{aligned} \quad (5.2)$$

Las variables  $(d_{j,i}, \theta_{j,i}, \phi_{j,i})$  son las coordenadas esféricas del origen del sistema  $i$  en el sistema  $j$ .  $j_p^3$  es la función esférica de Bessel de tercer tipo de tercer orden y  $P$  los polinomios asociados de Legendre.

Los coeficientes  $a_q$ , denominados coeficientes de Gaunt, son los factores de la expansión en polinomios de Legendre del producto de dos de ellos.

$$P_n^{-m}(x) P_\nu^\mu(x) = \sum_{q=0}^{q_{\max}} a_q P_p^{s+\mu}(x) \quad (5.3)$$

o en su forma alternativa

$$a_q = a(-m, n, \mu, \nu, p) = \frac{(2p+1)(p+m-\mu)!}{2(p-m+\mu)!} \int_{-1}^1 P_n^{-m}(x) P_\nu^\mu(x) P_p^{s+\mu}(x) dx \quad (5.4)$$

---

<sup>1</sup> Xu 1996a, Xu 1997, Xu 1998

Emparentados con los Clebsch-Gordan, los coeficientes de Gaunt pueden ser calculados como un producto de elementos de Wigner  $3jm^1$  o a través de una relación de recurrencia entre ellos.<sup>2</sup>

Los coeficientes  $b_q$  se definen en función de los  $a_q$ , según

$$\begin{aligned}
 & \text{Si } A_{p+2} \neq 0, \\
 & b_q = \frac{2p+3}{A_{p+2}} \left[ (p+2)(p_1+1)\alpha_{p+1}a_q - (p+1)(p_2+2)\alpha_{p+2}a_{q-1} \right] \\
 & \text{Si } A_{p+2} = 0, \\
 & b_q = \frac{2p+3}{(p+3)(p_1+2)A_{p+4}} \\
 & \times \left\{ A_{p+3}A_{p+4} + (p+2)(p+4)(p_1+3)(p_2+3)\alpha_{p+3} \right\} a_q \\
 & - (p+2)(p+3)(p_2+3)(p_2+4)\alpha_{p+4}a_{q-2} \}
 \end{aligned} \tag{5.5}$$

con

$$\begin{aligned}
 A_p &= -p(p-1)(m+\mu) + (m-\mu)(n-\nu)(n+\nu+1), \\
 p_1 &= p+m-\mu, \\
 p_2 &= p-m+\mu, \\
 \alpha_p &= \frac{[p^2 - (n-\nu)^2][p^2 - (n+\nu+1)^2]}{(4p^2-1)}
 \end{aligned} \tag{5.6}$$

Cuando  $A_{p+2}=A_{p+4}=0$ ,  $B_{mm}^{\mu\nu} = 0$ . Esto incluye los casos,

- $\mu = m = 0$ .
- $\mu = -m$  y  $\nu = n$ .

También es nulo este coeficiente cuando:

- $m = n$  y  $\mu = -\nu$ .
- $m = -n$  y  $\mu = \nu$ .

---

<sup>1</sup> Cruzan 1962

<sup>2</sup> Xu 1996b

Si las partículas están alineadas en el eje  $z$ , los coeficientes de translación son no nulos cuando  $\mu = m$ , y los únicos coeficientes de Gaunt involucrados son los  $a(-m, n, m, \nu, p)$ . Si la translación es en el sentido positivo de  $z$  ( $\cos(\theta_{j,i}) = 1$ )

$$\begin{aligned} A_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) &= C_o \sum_{q=0}^{q_{\max}} (-1)^p C_p a_q j_p^{(3)}(kd_{j,i}) \\ B_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) &= C_o \sum_{q=1}^{Q_{\max}} (-1)^{p+1} b_q j_{p+1}^{(3)}(kd_{j,i}) \end{aligned} \quad (5.7)$$

mientras que si la translación es en el sentido negativo ( $\cos(\theta_{j,i}) = -1$ ), deben multiplicarse las expresiones por  $(-1)^{n+\nu}$ .

Es posible encontrar relaciones entre los coeficientes de translación, como la de inversión espacial que se muestra en (5.8) y que vincula los coeficientes de pasar del sistema  $i$  a  $j$ , con los de  $j$  a  $i$ .

$$\begin{aligned} A_{mn}^{\mu\nu}(i \rightarrow j) &= (-1)^{n+\nu} A_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \\ B_{mn}^{\mu\nu}(i \rightarrow j) &= (-1)^{n+\nu+1} B_{mn}^{\mu\nu}(j \rightarrow i) \end{aligned} \quad (5.8)$$

Existen otras relaciones de simetría<sup>1</sup> que permiten reducir la cantidad de elementos que deben ser calculados y guardados.

---

<sup>1</sup> Kim 2004

## Bibliografía

- Axelrod, D. (2001). "Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology." Traffic **2**(11): 764-774.
- Axelrod, D., Burghardt, T. P., et al. (1984). "Total Internal Reflection Fluorescence." Annual Review of Biophysics and Bioengineering **13**(1): 247-268.
- Bass, M., Van Stryland, E. W., et al. (1995). Handbook of Optics, Volume I & II, McGraw-Hill, New York.
- Betzig, E., Patterson, G. H., et al. (2006). "Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution." Science **313**(5793): 1642-1645.
- Bohren, C. F. and Huffman, D. R. (1983). Absorption and Scattering of light by small particles. New York, Wiley-Interscience.
- Boyer, D., Tamarat, P., et al. (2002). "Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers." Science **297**(5584): 1160-3.
- Chew, H., Wang, D. S., et al. (1979). "Elastic Scattering of evanescent electromagnetic waves." Applied Optics **18**: 2679-2687.
- Costantino, S., Heinze, K. G., et al. (2005). "Two-Photon Fluorescent Microlithography for Live-Cell Imaging." Microscopy Research and Technique **68**(5): 272.
- Cruzan, O. R. (1962). "Translational addition theorems for spherical vector wave functions." Quarterly of Applied Mathematics **20**: 33-40.
- Dijka, M. A. v., Tchebotarevaa, A. L., et al. (2006). "Absorption and Scattering microscopy of single metal nanoparticles." Physical Chemistry Chemical Physics **8**: 3486-3495.
- Draine, B. T. (1988). "The discrete-dipole approximation and its application to interstellar graphite grains." The Astrophysical Journal **333**: 848.
- Draine, B. T. and Flatau, P. J. (1994). "Discrete-dipole approximation for Scattering calculations." Journal of the Optical Society of America A **11**(4): 1491-1499.
- Esa, A., Edelmann, P., et al. (2000). "Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome." Journal of Microscopy **199**(2): 96-105.
- Forster, T. (1959). "10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation." Discussions of the Faraday Society **27**: 7-17.
- Fuller, K. A. and Kattawar, G. W. (1988a). "Consummate solution to the problem of classical electromagnetic Scattering by an ensemble of spheres. I: Linear chains." Optics Letters **13**: 90-92.
- Fuller, K. A. and Kattawar, G. W. (1988b). "Consummate solution to the problem of classical electromagnetic Scattering by an ensemble of spheres. II: Clusters of arbitrary configuration." Optics Letters **13**: 1063-1065.
- Geddes, C. D., Parfenov, A., et al. (2003). "Luminescent blinking from silver nanostructures." The Journal of Physical Chemistry B **107**(37): 9989-9993.

- Goodman, J. (2004). Introduction to Fourier Optics, Roberts & Company Publishers.
- Grecco, H. E., Lidke, K. A., et al. (2004). "Ensemble and single particle photophysical properties (two-photon excitation, anisotropy, FRET, lifetime, spectral conversion) of commercial quantum dots in solution and in live cells." Microscopy Research and Technique **65**(4-5): 169-179.
- Grecco, H. E. and Martínez, O. E. (2006). "Distance and orientation measurement in the nanometric scale based on polarization anisotropy of metallic dimers." Applied Optics **14**(19): 8716-8721.
- Gustafsson, M. G. L., Agard, D. A., et al. (1999). "I 5 M: 3D widefield light microscopy with better than 100nm axial resolution." Journal of Microscopy **195**(1): 10–16.
- Gustafsson, M. G. L., Agard, D. A., et al. (2003). "Sevenfold improvement of axial resolution in 3D wide-field microscopy using two objective-lenses." Proceedings of SPIE **2412**: 147.
- Heintzmann, R., Jovin, T. M., et al. (2002). "Saturated patterned excitation microscopy-a concept for optical resolution improvement." Journal of the Optical Society of America A **19**(8): 1599-1609.
- Hell, S. W., Lindek, S., et al. (2006). "Measurement of the 4Pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution." Applied Physics Letters **64**(11): 1335-1337.
- Hell, S. W. and Wichmann, J. (1994). "Breaking the diffraction limit resolution by stimulated emission: stimulated-emission-depletion microscopy." Optics Letters **19**: 780–783.
- Jackson, J. D. (1998). "Classical Electrodynamics." Classical Electrodynamics, 3rd Edition, by John David Jackson.
- Kattawar, G. W. and Plass, G. N. (1967). "Electromagnetic Scattering from Absorbing Spheres." Applied Optics **6**(8): 1377-1382.
- Kim, K. T. (2004). "Symmetry relations of the translation coefficients of the spherical scalar and vector multipole fields." Progress in electromagnetics research **48**: 45-66.
- Klar, T. A., Dyba, M., et al. (2001). "Stimulated emission depletion microscopy with an offset depleting beam." Applied Physics Letters **78**(4): 393.
- Konig, K. (2000). "Multiphoton microscopy in life sciences." Journal of Microscopy **200**(2): 83-104.
- Kunik, D., Ludueña, S. J., et al. (2006). "Fluorescent Two-Photon Nanolithography." Journal of Microscopy: (enviado).
- Lakowicz, J. R. (1983). Principles of fluorescence spectroscopy. New York, Plenum Press.
- Lee, N. K., Kapanidis, A. N., et al. (2005). "Accurate FRET Measurements within Single Diffusing Biomolecules Using Alternating-Laser Excitation." Biophysical Journal **88**(4): 2939-2953.
- Lidke, K., Rieger, B., et al. (2005). "Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics." Optics Express **13**(18): 7052-7062.
- Lindfors, K., Kalkbrenner, T., et al. (2004). "Detection and Spectroscopy of Gold Nanoparticles Using Supercontinuum White Light Confocal Microscopy." Physical Review Letters **93**(3): 37401.
- Liu, G. L., Yin, Y., et al. (2006). "A nanoplasmonic molecular ruler for measuring nuclease activity and DNA footprinting." Nature Nanotechnology **1**(1): 47-52.
- Mackowski, D. W. (1991). "Analysis Of Radiative Scattering For Multiple Sphere Configurations." Proceedings Of The Royal Society Of London Series A-Mathematical Physical And Engineering Sciences **433**(1889): 599-614.
- Masip, M. (2006). "Modelado de nanopartículas y generación de luz blanca". Licenciado, Departamento de Física, Univesidad de Buenos Aires.

- Nomarski, G. and Weill, A. R. (1955). "Application ala métallographie des méthodes interférentielles adeux ondes polarisées." Revue de metallurgie **52**: 121-134.
- Ober, R. J., Ram, S., et al. (2004). "Localization Accuracy in Single-Molecule Microscopy." Biophysical Journal **86**(2): 1185-1200.
- Purcell, E. M. and Pennypacker, C. R. (1973). "Scattering and Absorption of Light by Nonspherical Dielectric Grains." The Astrophysical Journal **186**: 705.
- Quinten, M., Pack, A., et al. (1999). "Scattering and extinction of evanescent waves by small particles." Applied Physics B: Lasers and Optics **68**(1): 87-92.
- Reinhard, B. M., Siu, M., et al. (2005). "Calibration of dynamic molecular rule based on plasmon coupling between gold nanoparticles." Nano Letters **5**(11): 2246-2252.
- Selvin, P. R. (2000). "The renaissance of fluorescence resonance energy transfer." Nature Structural and Molecular Biology **7**(9): 730-734.
- Sonnichsen, C., Reinhard, B. M., et al. (2005). "A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles." Nature Biotechnology **23**(6): 741-745.
- Stryer, L. and Haugland, R. P. (1967). "Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler." Proceedings of the National Academy of Sciences **58**(2): 719-726.
- Suzuki, K., Fujiwara, T., et al. (2004). "Rapid diffusion of putative raft molecules indicative of the absence of large stable rafts in the resting-state cell membrane." Biophysical Journal **86**(9).
- Suzuki, K., Ritchie, K., et al. (2005). "Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques." Biophysical Journal **88**(5): 3659-3680.
- Syed, S., Snyder, G. E., et al. (2006). "Adaptability of myosin V studied by simultaneous detection of position and orientation." Embo Journal **25**(9): 1795-1803.
- Toprak, E., Enderlein, J., et al. (2006). "Defocused orientation and position imaging (DOPI) of myosin V." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **103**(17): 6495-6499.
- Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." Annual Review of Biochemistry **67**(1): 509-544.
- van Vliet, L., Sudar, D., et al. (1998). Digital Fluorescence Imaging Using Cooled CCD Array Cameras. Cell Biology. J. E. Celis. New York, Academic Press. **3**: 109-120.
- Wang, H., Huff, T. B., et al. (2005). "In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(44): 15752-15756.
- Wannemacher, R., Pack, A., et al. (1999). "Resonant absorption and Scattering in evanescent fields." Applied Physics B: Lasers and Optics **68**(2): 225-232.
- Weber, P. C., Cox, M. J., et al. (1987). "Crystallographic data for Streptomyces avidinii streptavidin." Journal of Biological Chemistry **262**(26): 12728-12729.
- White, J. G. and Amos, W. B. (1987). "Confocal microscopy comes of age." Nature **328**(6126): 183-184.
- Wu, P. and Brand, L. (1994). "Resonance energy transfer: methods and applications." Analytical biochemistry **218**(1): 1-13.
- Xu, Y. (1996a). "Calculation of the addition coefficients in electromagnetic multisphere-Scattering theory." Journal of Computational Physics **127**: 285-298.
- Xu, Y. (1996b). "Fast evaluation of the Gaunt coefficients." Mathematics of Computation **65**(216): 1601-1612.

- Xu, Y. (1997). "Erratum: Calculation of the addition coefficients in electromagnetic multisphere-Scattering theory." Journal of Computational Physics **134**: 200.
- Xu, Y. (1998). "Efficient evaluation of vector translation coefficients in multiparticle light-Scattering theories." Journal of Computational Physics **139**: 137-165.
- Xu, Y. L. (1995). "Electromagnetic Scattering By An Aggregate Of Spheres." Applied Optics **34**(21): 4573-4588.
- Yelin, D., Oron, D., et al. (2003). "Multiphoton plasmon-resonance microscopy." Optics Express **11**(12): 1385-1391.
- Yildiz, A., Forkey, J. N., et al. (2003). "Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1. 5-nm Localization." Science **300**(5628): 2061.
- Zernike, F. (1942). "Phase-contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects. Part I." Physica **9**: 686-698.
- Zhang, J., Campbell, R. E., et al. (2002). "Creating New Fluorescent Probes for Cell Biology." Nature Reviews Molecular Cell Biology **3**(12): 906-918.

## Agradecimientos

Es difícil sintetizar en un par de páginas lo recibido durante el doctorado. Son numerosas experiencias con muchas personas que de una forma u otra aportaron para llegar a hoy.

En primer lugar, a Oscar. Los que hemos trabajado con él conocemos la generosidad que tiene con su tiempo, su trabajo y sus ideas. A su lado se aprende mucha física, pero también otras cosas que hacen falta para desempeñarse correctamente en la profesión que elegimos. El buen clima que se respira en el LEC es fruto de su impronta. Si algún día tengo a cargo un laboratorio, ojalá sepa crear un ambiente de trabajo, aprendizaje y de compañerismo como el que viví estos años.

Del Laboratorio, la lista de agradecimientos es extensa. A Darío, un gran compañero y una gran persona. A Martín, un gusto grande compartir el tema de cálculo con vos. A Alberto, de compañero de F2 a compañero del LEC, a quien le envidio su constancia y aplomo. A Laura con quien compartí no sólo estos años de doctorado sino también parte de la carrera. A Valeria, una gran adquisición para el departamento y el laboratorio que lamentaré mucho cuando se vaya. A Andrea, es extraño pensar que cuando yo entre en el LEC, vos te estabas doctorando; y ahora que vos volviste, me doctoro yo. A Gaby, con quien compartí más años de doctorado. A Andrés con el que espero trabajar nuevamente. A los distintos grupos de Laboratorio 6y7 que pasaron. Finalmente a Mario, que armó parte del laboratorio.

A los que pasaron por el LEC antes, especialmente a Yanina, Ariel y Richie. Santiago, tu legado computacional está intacto esperando tu vuelta.

Un párrafo aparte se merecen José María, Eduardo y Maxi. Sin su apoyo, disponibilidad y experiencia sería extremadamente difícil llevar adelante los proyectos.

No puedo dejar de mencionar a Maxi Lantz. Son incontables las veces que en este año y medio se me aparecieron temas, preguntas, ideas que me hubiera gustado discutir con vos. Con tu estilo inquisitivo y didáctico me abriste la cabeza a muchas cuestiones. Lamento profundamente no haber tenido tiempo para más.

Hay gente que, si bien ya no está en el LEC, siguen cerca temática y geográficamente. Silvio, tu entusiasmo y tu deseo por entender hasta el último tornillo como funcionan las cosas en las que trabajas te hacen un colega valioso. Lía, gracias por tu preocupación y por tu tiempo empeñado en organizar cursos y charlas.



Quisiera agradecer a todos los que ponen el hombro para construir una universidad, facultad y un departamento de los que uno puede sentirse orgulloso y en los que quiera trabajar. Especialmente a Ana, Laura, Darío y Guillermo con los que compartí mas fuertemente el trabajo y a Willy Dussel de quien tuve la oportunidad de aprender muchísimo.

A Tom Jovin y al grupo de Biología Molecular del Max Planck de Biofísica Química. El aprendizaje interdisciplinario se lo debo principalmente a ellos que me recibieron y me enseñaron.

A mis amigos de toda la vida, Santiago, Guille, Mario, Nacho, Gonzalo, Álvaro y Luís. Los años pasan y las mesas se agrandan. Hoy tenemos que multiplicar por dos cada lugar en la mesa, la próxima tal vez será por tres. Es muy bueno compartir las etapas con ustedes.

Al final, pero de cierta forma antes que a todos, a mi familia. A Pachi y Fran que me alegran cada día de mi vida, me bancaron en este proceso y me acompañan en el que viene.

A mis viejos, que estos años de cambio me ayudaron en todo. La lista de cosas es larguísima. Gracias.

A mis primos, Mercedes, Matías, Diego, María y Pablo; y mis tíos, Edgardo y Valeria; Estela y Miguel, que son una extensión de mi familia chica.

A Ame y Bar, mis hermanas que elegí. Como aquella vez hace cinco años, los tres nos egresamos juntos. Pero a diferencia de entonces, tenemos la dicha de haber compartido juntos el transcurso para llegar acá. A papá por estos nuevos momentos compartidos.

Finalmente a Estela, Corina y Betty por estar siempre presentes en los momentos importantes de mi vida.