

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Física



Desarrollo de un microscopio óptico de
campo oscuro con capacidad espectral para
estudio de materiales nanoestructurados

Trabajo final de la Licenciatura en Física

por

Ana Belén Wendel

Directores

Dr. Rodrigo E. Palacios y Dr. Mauro Cuevas

Febrero de 2020

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos,

A mi Director Rodrigo Palacios, por la oportunidad que me brindó al proponerme este trabajo, por todo lo que me ha enseñado, por su predisposición, su paciencia y motivación.

A mi Director Mauro Cuevas, por brindarme su conocimiento y por sus aportes en la teoría.

A Rodrigo Ponzio, por su valiosa asesoría, por brindarme su tiempo y paciencia, y por acompañarme a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A mi familia que siempre estuvo presente brindándome su apoyo y cariño. A mis padres María y Juan quienes me enseñaron la importancia de estudiar y me dieron la oportunidad de formarme en una carrera universitaria. A mi hermano Herman, por sus consejos y apoyo.

A todos los docentes y compañeros del departamento de física por su apoyo y amistad, especialmente a mis amigas Juli y Ju, con quienes he compartido momentos inolvidables durante estos años.

A todos mis seres queridos por el apoyo y cariño constante que me brindan.

A Dinámica Estudiantil Exactas, por brindarme la oportunidad de participar y permitirme conocer la Universidad de otra manera. Los momentos compartidos y las amistades formadas hicieron que mi experiencia como estudiante adquiriera más valor.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, que me brindó la posibilidad realizar mis estudios de grado y formarme en una carrera de Ciencias Exactas.

Resumen

En la primera parte de este trabajo especial, se diseñó y montó un microscopio de campo oscuro. Así mismo, para testear el funcionamiento del microscopio, se adquirieron imágenes de campo oscuro de nanopartículas (NPs) de poliestireno ($d = (220 \pm 6)$ nm), NPs de oro recubiertas con albúmina ($d \approx 30$ nm) y NPs de oro ($d = (80 \pm 2)$ nm). En la segunda parte de este trabajo, se implementó el método de seguimiento de partículas individuales y análisis de movimiento browniano (Single Particle Tracking Brownian motion Analysis, SPT-BM) para determinar el diámetro hidrodinámico de NPs de poliestireno utilizando el microscopio desarrollado. Por último, se estudió la capacidad de caracterización espectral del microscopio por medio de la obtención de espectros de NPs individuales de oro de $d = (80 \pm 2)$ nm de diámetro.

Palabras claves: microscopia, campo oscuro, espectro de dispersión, nanopartículas, movimiento browniano.

Abstract

In the first part of this thesis, a dark field microscope was designed and mounted. Likewise, to test the operation of the microscope, dark-field images of polystyrene nanoparticles (NPs) ($d = (220 \pm 6)$ nm), gold NPs coated with albumin ($d \sim 30$ nm) and gold NPs ($d = (80 \pm 2)$ nm) were acquired. In the second part of this work, the method of tracking individual particles and Brownian motion analysis (SPT-BM) was used to determine the hydrodynamic diameter of polystyrene NPs using the microscope developed. Finally, the spectral characterization capacity of the microscope was studied by obtaining spectra of individual gold NPs of diameter $d = (80 \pm 2)$ nm.

Keywords: microscopy, dark field, dispersion spectrum, nanoparticles, Brownian motion.

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	III
Abstrac	V
1. Introducción	1
1.1. Microscopía de campo oscuro	2
1.2. Microscopía de campo oscuro espectral	5
1.3. Propiedades opticas de nanopartículas metálicas	7
1.3.1. Dispersión en metales nobles	8
1.3.2. Dispersión por partículas esféricas	10
1.3.3. Dispersión de Rayleigh	16
1.4. Movimiento browniano	20
2. Objetivos	25
2.0.1. Objetivo general	25
2.0.2. Objetivos específicos	25
3. Construcción del microscopio de campo oscuro	27
3.1. Elaboración del conjunto de excitación	30
3.2. Estructura del microscopio	33
3.3. Utilización del microscopio	37

4. Resultados	39
4.1. Adquisición de imágenes	39
4.1.1. Preparación de la muestra	39
4.1.2. Imágenes de campo oscuro	41
4.2. Determinación del tamaño de NPs de poliestireno	43
4.3. Caracterización espectral	47
4.3.1. Cálculo de la potencia dispersada	47
4.3.2. Adquisición de espectros	49
4.3.3. Adquisición de espectros de NPs de oro	51
5. Conclusión	57
Bibliografía	59

Capítulo 1

Introducción

La investigación en Nanociencia es un área de intenso interés y continuo avance. Como consecuencia, la Nanotecnología ha tenido un desarrollo acelerado en los últimos años puesto que presenta un enorme potencial de aplicaciones en diferentes áreas científicas y tecnológicas. Uno de los objetivos de la nanotecnología es la obtención de nanopartículas (NPs) de diversos elementos metálicos con formas y tamaños diferentes, que presentan propiedades ópticas [1], electrónicas, magnéticas y catalíticas únicas. Esto ha llevado también a la necesidad de desarrollar y perfeccionar diferentes microscopios y técnicas para el estudio de los materiales nanoestructurados, permitiendo su adecuada caracterización.

La microscopia óptica de campo oscuro es una técnica ampliamente utilizada debido a que permite detectar y caracterizar materiales nanoestructurados ([2],[3],[4],[5]). Dicha técnica consiste en irradiar una muestra de interés con una fuente de luz con determinadas características, para luego coleccionar la radiación dispersada por los nano-objetos presentes en la muestra y así formar una imagen microscópica (micrografía) con contraste de campo oscuro. La habilidad de la microscopia óptica de campo oscuro para estudiar materiales tanto blandos como duros permite que la misma sea utilizada ampliamente

en ciencias biológicas y en ciencias de los materiales. Recientemente dicha técnica fue re-descubierta para el estudio de nanopartículas metálicas ([6],[7]). Acoplado un espectrógrafo de imagen y una cámara CCD a un microscopio de campo oscuro es posible medir el espectro de dispersión de Rayleigh de partículas individuales ([6]). Esto permite obtener información sobre dichas partículas, como su tamaño, forma geométrica y composición ([2]). Así mismo, al acoplar equipamiento electroquímico a dicho sistema es posible aplicar técnicas avanzadas para estudiar procesos electrocatalíticos y/o plasmónicos a nivel de partícula individual.

A continuación, se exponen las propiedades de la microscopía de campo oscuro y se mencionan las condiciones requeridas para su correcto funcionamiento. Además, se explican brevemente los conceptos físicos involucrados en el proceso de formación de imágenes, adquisición y análisis de datos.

1.1. Microscopía de campo oscuro

El microscopio de campo oscuro, inventado por Richard Adolf Zsigmondy en 1903, ha sido recientemente re-descubierto para el estudio de partículas individuales mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz visible, permitiendo observar los efectos de su tamaño, forma y composición, [8]. También, posibilita analizar sistemas nanoestructurados no fluorescentes y detectar con gran facilidad partículas sólidas con índices de refracción muy cercanos al del medio en que se encuentran. La microscopía de campo oscuro es una técnica de imagen cuyo sistema de iluminación permite lograr el contraste de la imagen mediante el fenómeno de dispersión de luz como se describe detalladamente a continuación.

La Figura 1.1 muestra un esquema simplificado de un microscopio de campo oscuro. En una configuración típica, la luz procedente de una fuente pequeña

(cuasi-puntual) es colectada y colimada por una lente colectora. El haz colimado es entonces interceptado por un disco-opaco/máscara-circular (que absorbe o refleja totalmente la luz) concéntrico al haz y de menor diámetro, produciendo un anillo exterior de luz colimada. Una lente condensadora enfoca el haz resultante, en forma de cono de luz hueco, hacia la muestra. La mayoría de la luz se transmite directamente, mientras que algunos rayos son dispersados por la muestra. Parte de la luz dispersada entra en el objetivo, mientras que la luz transmitida directamente no es colectada por el objetivo debido a la falta de coincidencia entre el ángulo y la forma del haz de iluminación y el ángulo de colección del lente objetivo (asociado a su apertura numérica, NA, por sus siglas en inglés). En consecuencia, sólo la luz dispersa y colectada por el lente objetivo produce una imagen, mientras que la luz transmitida directamente se omite, produciendo el aspecto clásico de un fondo oscuro (casi negro) con objetos brillantes (que dispersan la luz) sobre él.

Para garantizar que la luz de la fuente no formará parte de la imagen y la lente objetivo solo recogerá la luz dispersada por la muestra en observación, la apertura numérica del condensador NA_C debe ser aproximadamente un 15% mayor que la apertura numérica de la lente del objetivo NA_O [9],[10]. El ángulo del haz de incidencia α y el ángulo de colección β están determinados por NA_C y NA_O , respectivamente

$$\alpha = \text{sen}^{-1}(NA_C) \quad (1.1)$$

$$\beta = \text{sen}^{-1}(NA_O) \quad (1.2)$$

Mediante el análisis geométrico del sistema, se puede determinar el diámetro \mathcal{D} que debe poseer el disco de bloqueo para evitar que la luz proveniente de la fuente sea colectada por el objetivo. El tamaño de este elemento está determinado por la apertura numérica del lente objetivo y la distancia focal del lente condensador \mathcal{F}_C

$$\mathcal{D} \geq 2\mathcal{F}_C \tan [\text{sen}^{-1}(NA_O)] \quad (1.3)$$

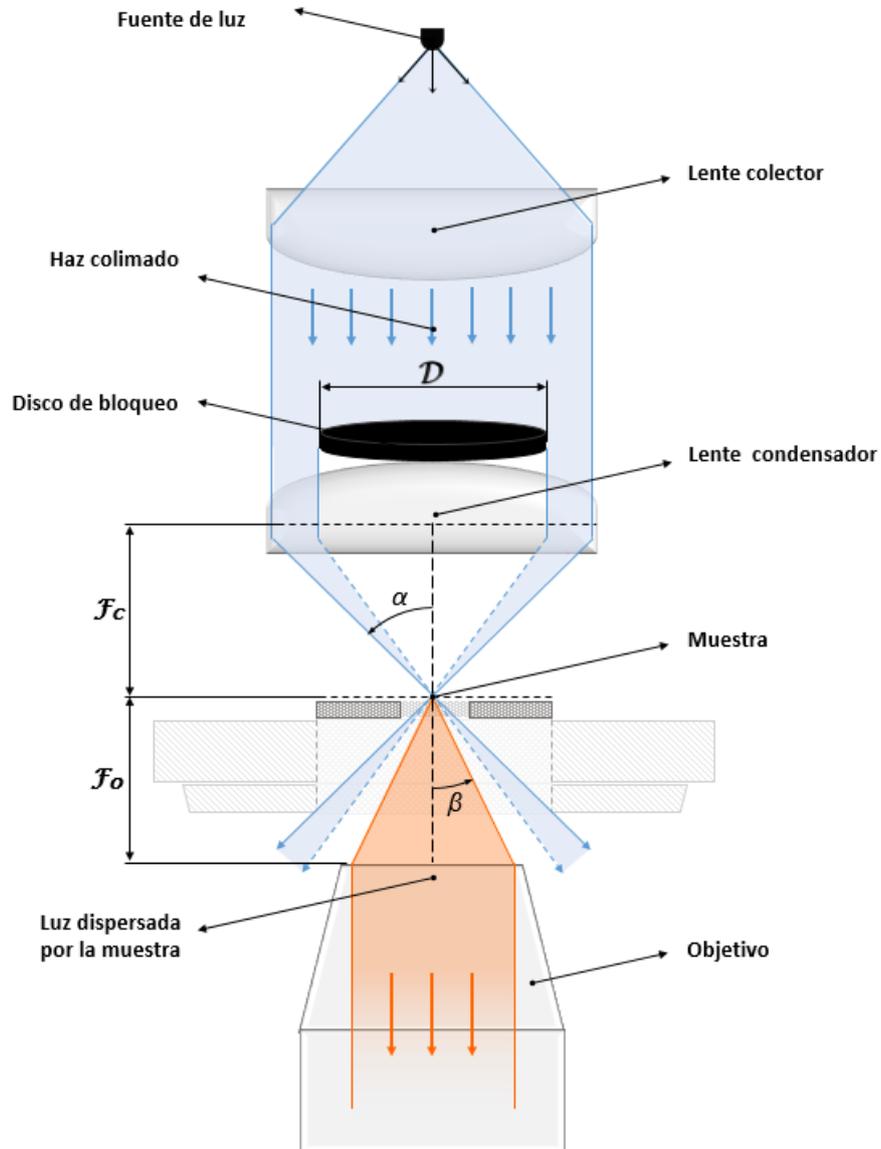


Figura 1.1: Esquema general del microscopio de campo oscuro, en el mismo se muestra la relación angular de dispersión indicando los ángulos de incidencia del haz α y de colección de luz dispersada β . Se señalan las distancias focales de condensador \mathcal{F}_c y del objetivo \mathcal{F}_o , y el diámetro del disco de bloqueo D .

1.2. Microscopía de campo oscuro espectral

La microscopía de campo oscuro espectral combina la resolución espacial y la capacidad espectral del microscopio permitiendo obtener tanto la intensidad como las propiedades espectrales de una muestra para cada píxel de la imagen.

La capacidad de adquirir los espectros de NPs empleando el microscopio de campo oscuro se obtiene mediante la modificación del camino óptico de adquisición. Ésta modificación consiste en agregar al microscopio un dispositivo dispersivo llamado *espectrómetro de imagen* (Andor, Shamrock 303i). Este instrumento permite capturar los espectros de radiación para cada píxel de la imagen para luego combinar y formar una imagen tridimensional hiperespectral (cubo hiperespectral) para el procesamiento y análisis de datos.

En la Figura 1.2 se muestra un esquema un espectrómetro de imagen, el cual esta representado por el conjunto de elementos: Rendija, elemento dispersivo y óptica del espectrómetro. Este debe estar ubicado entre el lente tubo y el detector del microscopio (cámara CCD).

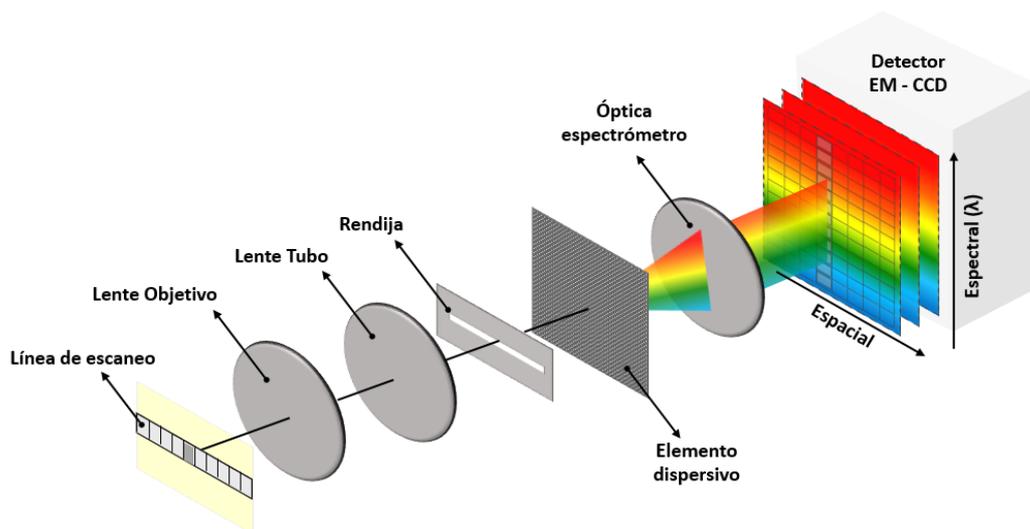


Figura 1.2: Diagrama de un arreglo para microscopía de campo oscuro espectral.

La rendija de entrada es motorizada, esta apertura variable permite ajustar su ancho de acuerdo a las condiciones convenientes de cada medición ($10 \mu\text{m} - 2500 \mu\text{m}$), el tamaño de este elemento es un parámetro importante a tener en cuenta para tomar imágenes de espectros. Su función es dejar pasar sólo una pequeña fracción de la imagen que luego será dispersada perpendicularmente a la dirección de la rendija por el elemento dispersivo para lograr nuevamente una imagen bidimensional. En general, el tamaño se reduce ($50 \mu\text{m} - 100 \mu\text{m}$) para tomar espectros de partículas individuales. En particular, las mediciones realizadas para este trabajo se tomaron con un ancho de rendija de $1500 \mu\text{m}$. Esto permitió obtener una gran cantidad de espectros de partículas por cada adquisición y reducir el tiempo de medición.

El elemento dispersivo (rejilla de difracción de alto rendimiento 50 mm^{-1} blaze 600) se encarga de separar espacialmente un espectro de radiación incidente (dispersa en distintos ángulos los fotones con distintas energías). De esta manera, el espectro se dispersa en una dirección perpendicular a la rendija, mientras que la imagen se retransmite paralela a la rendija. Esto genera una imagen bidimensional que, en la dirección perpendicular de la rendija, tiene dimensiones proporcionales a longitudes de onda (dimensiones espectrales), mientras que en la dirección paralela a la rendija conserva inalteradas sus dimensiones espaciales. La óptica del espectrómetro es un conjunto de elementos ópticos (usualmente espejos) que se encargan de corregir las posibles aberraciones ópticas y redirigir la imagen final del espectro hacia el detector.

Contando con una plataforma nanoposicionadora en donde se coloca la muestra, se puede recorrer la superficie en observación de la muestra y obtener imágenes de cuadro a cuadro para construir el cubo de datos hiperespectral (Figura 1.3). La imagen de la muestra sobre la rendija es acotada en la dimensión x (perpendicular al largo de la apertura) mientras que en la

dimensión y la imagen pasa inalterada a través de la rendija, y luego es dispersada por la red de difracción formando una imagen (y, λ) . Para reconstruir un cubo hiperespectral, la muestra es desplazada de manera tal que su imagen sobre la rendija se mueva en la dirección x .

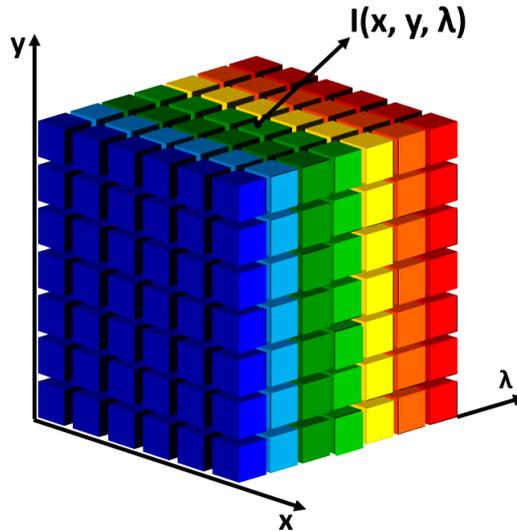


Figura 1.3: Representación de un cubo hiperespectral.

1.3. Propiedades ópticas de nanopartículas metálicas

Las propiedades ópticas de los metales pueden explicarse mediante un *modelo de plasma*. La rama de la nanociencia que estudia estos fenómenos se llama Plasmónica. A frecuencias ópticas es posible inducir excitaciones colectivas de los electrones de conducción de nanoestructuras metálicas produciendo oscilaciones en la densidad de carga superficial, denominadas *plasmones* [11].

1.3.1. Dispersión en metales nobles

La interacción de los metales con los campos electromagnéticos está regida en gran medida por los electrones libres y sus propiedades dispersivas pueden ser descritas por medio de una función dieléctrica compleja. Producto de la radiación, el metal adquiere carácter dieléctrico y permite la propagación de ondas electromagnéticas. Los electrones oscilan en respuesta al campo aplicado y su movimiento es amortiguado por las colisiones que ocurren con una frecuencia de colisión característica $\gamma = \frac{1}{\tau}$, siendo τ el tiempo de relajación de un gas de electrones libres. Por tal motivo, los electrones de conducción en un metal constituyen un *plasma*, puesto que pueden considerarse análogos a un gas de partículas cargadas que responde colectivamente a los campos electromagnéticos. Considerando el movimiento de un electrón del plasma sujeto a un campo eléctrico con dependencia temporal armónica se puede obtener que la contribución de los electrones desplazados al desplazamiento dieléctrico \mathbf{D} es [12]

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \right) \mathbf{E} \quad (1.4)$$

donde ω es la frecuencia angular de la radiación incidente, ε_0 es la permitividad eléctrica, \mathbf{E} es el campo eléctrico y $\omega_p^2 = \frac{n_0 e^2}{\varepsilon_0 m_e}$ es la *frecuencia del plasma* del gas de electrones libres, siendo n_0 la densidad de electrones libres por átomo y e y m_e la carga y masa del electrón. De este resultado se obtiene que la función dieléctrica del gas de electrones libres es:

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (1.5)$$

Para frecuencias cercanas a ω_p , el producto $\omega\tau \gg 1$ y el amortiguamiento resulta despreciable. Por lo que $\varepsilon(\omega)$ es predominantemente real y

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (1.6)$$

puede utilizarse como la función dieléctrica del plasma de electrones libres no amortiguado [12]. En el caso de los metales nobles, la validez de esta aproximación se ve limitada a causa de las transiciones entre bandas que ocurren en la región del espectro visible. Debido a esto, se necesita una extensión de este modelo en la región $\omega > \omega_p$ (donde la respuesta está dominada por electrones libres s), ya que la banda llena d cerca de la energía de Fermi (ϵ_F) causa un ambiente altamente polarizado, (ver Figura 1.4).

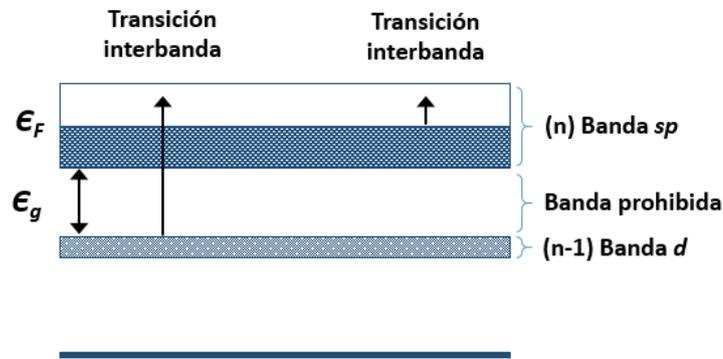


Figura 1.4: Esquema simplificado de las bandas de energía de los electrones de metales nobles. ϵ_g representa la energía del gap.

Esta polarización residual debido al fondo positivo de los núcleos se puede describir agregando el término $\mathbf{P}_\infty = \epsilon_0(\epsilon_\infty - 1)\mathbf{E}$ al desplazamiento dieléctrico $D = \epsilon_0\mathbf{E} + \mathbf{P}$, donde \mathbf{P} representa a la polarización debida a los electrones libres. Por lo tanto, este efecto se describe mediante una constante dieléctrica ϵ_∞ (usualmente $1 \leq \epsilon_\infty \leq 10$), y se puede escribir

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad (1.7)$$

La validez de la ecuación (1.7) se ilustra para el caso del oro en la Figura 1.5. En la misma se muestran los componentes reales e imaginarios, ϵ_1 y ϵ_2 , respectivamente, ajustados a la función dieléctrica del oro determinada experimentalmente [13]. Es apreciable como en frecuencias correspondientes

al espectro visible (380 nm - 750 nm) la aplicabilidad del modelo del electrón libre se rompe, produciendo un aumento en ε_2 .

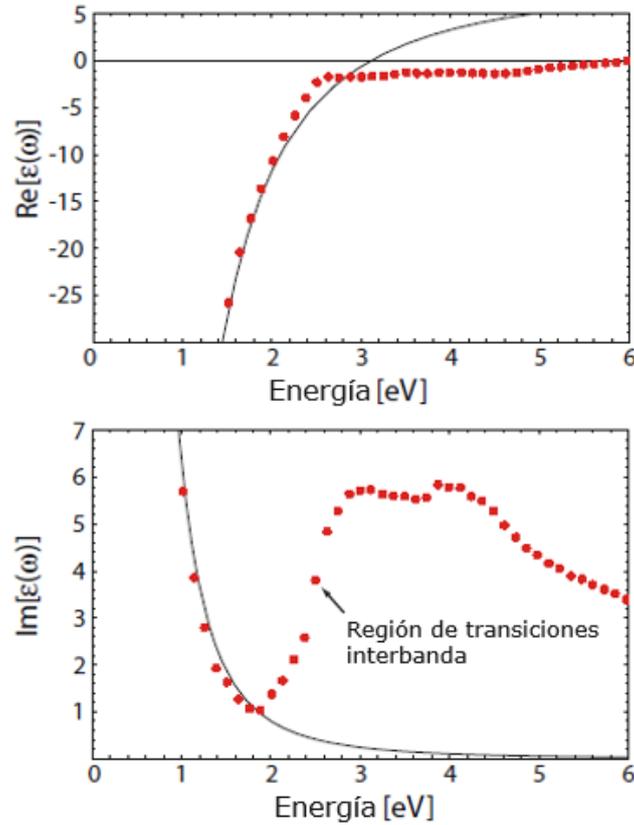


Figura 1.5: Función dieléctrica $\varepsilon(\omega)$ (ecuación 1.7) del gas de electrones libres (línea continua) ajustada a los valores de literatura de los datos dieléctricos para oro (puntos) [13]. Las transiciones entre bandas limitan la validez de este modelo a frecuencias de luz visible y más altas [12].

1.3.2. Dispersión por partículas esféricas

A principios del siglo XX, Gustav Mie desarrolló una teoría completa que describe los fenómenos de absorción y dispersión de la radiación electromagnética producida por una partícula esférica, con el propósito de

explicar los diversos colores exhibidos por partículas de oro coloidales en suspensión [14]. La teoría de Mie ofrece una solución analítica y exacta de las ecuaciones de Maxwell para la dispersión y absorción de la radiación electromagnética por partículas esféricas de tamaño arbitrario y describe los espectros de extinción (*extinción = dispersión + absorción*) de dichas partículas.

El campo electromagnético con dependencia temporal armónica de una onda electromagnética plana que se propaga en un medio lineal, no absorbente, isotrópico y homogéneo debe satisfacer la *ecuación de onda*:

$$\nabla^2 \mathbf{E} + k^2 \mathbf{E} = 0 \quad \nabla^2 \mathbf{H} + k^2 \mathbf{H} = 0 \quad (1.8)$$

donde \mathbf{E} el campo eléctrico, \mathbf{H} el campo magnético y $k^2 = \omega^2 \varepsilon \mu$. Siendo ω la frecuencia angular del campo incidente, ε la permitividad y μ la permeabilidad del medio. Cualquier campo vectorial con divergencia cero que satisface la ecuación de onda vectorial es un campo eléctrico admisible; el campo magnético asociado se obtiene por el rotor del campo eléctrico por $\nabla \times \mathbf{E} = i\omega\mu\mathbf{H}$.

Dado que se busca resolver la dispersión producida por una esfera, la solución debe satisfacer la ecuación de onda en coordenadas esféricas. Considerando una onda plana polarizada en x , con vector de onda k , que incide sobre una esfera homogénea e isotrópica de radio a , evaluamos el campo dispersado en un punto de observación \mathbf{P} de coordenadas (r, θ, ϕ) , (ver Figura 1.6). Dentro de la esfera el índice de refracción es $n_p = \sqrt{\varepsilon_p \mu_p}$, con permitividad ε_p y permeabilidad μ_p , y el índice del medio es $n = \sqrt{\varepsilon \mu}$, entonces el campo eléctrico incidente en coordenadas polares esféricas es:

$$\mathbf{E}_i = E_0 e^{ikr \cos \theta} \hat{\mathbf{e}}_x \quad (1.9)$$

donde

$$\hat{\mathbf{e}}_x = \text{sen } \theta \cos \phi \hat{\mathbf{e}}_r + \cos \theta \cos \phi \hat{\mathbf{e}}_\theta - \text{sen } \phi \hat{\mathbf{e}}_\phi \quad (1.10)$$

Aquí \mathbf{E}_0 es la amplitud compleja del campo eléctrico y $k = n\omega = 2\pi/\lambda$, siendo λ la longitud de onda en el medio.

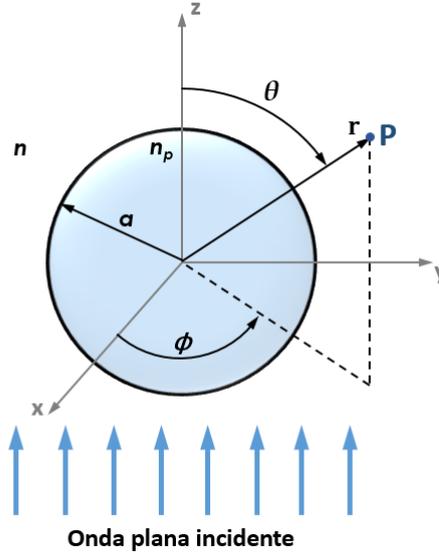


Figura 1.6: Onda plana x-polarizada incidiendo sobre una partícula esférica, isotrópica y homogénea de radio a , en la figura se muestran el sistema de coordenadas polares esféricas centradas dicha partícula

La solución de este problema es obtenida por medio de dos funciones vectoriales (\mathbf{M} y \mathbf{N}) que satisfacen la ecuación de onda y realizando la expansión de los campos en armónicos esféricos vectoriales [15].

$$\mathbf{M}_{\text{emn}}^{(1)} = -\frac{m}{\text{sen } \theta} \text{sen } m\phi P_\ell^m(\cos \theta) j_n(\rho) \hat{\mathbf{e}}_\theta - \cos m\phi \frac{dP_\ell^m(\cos \theta)}{d\theta} j_n(\rho) \hat{\mathbf{e}}_\phi, \quad (1.11)$$

$$\mathbf{M}_{\text{omn}}^{(1)} = \frac{m}{\text{sen } \theta} \cos m\phi P_\ell^m(\cos \theta) j_n(\rho) \hat{\mathbf{e}}_\theta - \sin m\phi \frac{dP_\ell^m(\cos \theta)}{d\theta} j_n(\rho) \hat{\mathbf{e}}_\phi, \quad (1.12)$$

$$\begin{aligned}
 \mathbf{N}_{\mathbf{emn}}^{(1)} &= \frac{j_n(\rho)}{\rho} \cos m\phi n(n+1) P_\ell^m(\cos\theta) \hat{\mathbf{e}}_r \\
 &\quad + \cos m\phi \frac{dP_\ell^m(\cos\theta)}{d\theta} \frac{1}{\rho} \frac{d}{d\rho} [\rho j_n(\rho)] \hat{\mathbf{e}}_\theta \\
 &\quad - m \operatorname{sen} m\phi \frac{P_\ell^m(\cos\theta)}{\operatorname{sen}\theta} \frac{1}{\rho} \frac{d}{d\rho} [\rho j_n(\rho)] \hat{\mathbf{e}}_\phi
 \end{aligned} \tag{1.13}$$

$$\begin{aligned}
 \mathbf{N}_{\mathbf{omn}}^{(1)} &= \frac{j_n(\rho)}{\rho} \operatorname{sen} m\phi n(n+1) P_\ell^m(\cos\theta) \hat{\mathbf{e}}_r \\
 &\quad + \operatorname{sen} m\phi \frac{dP_\ell^m(\cos\theta)}{d\theta} \frac{1}{\rho} \frac{d}{d\rho} [\rho j_n(\rho)] \hat{\mathbf{e}}_\theta \\
 &\quad + m \cos m\phi \frac{P_\ell^m(\cos\theta)}{\operatorname{sen}\theta} \frac{1}{\rho} \frac{d}{d\rho} [\rho j_n(\rho)] \hat{\mathbf{e}}_\phi
 \end{aligned} \tag{1.14}$$

Los subíndices \mathbf{e} y \mathbf{o} denotan una dependencia par e impar del ángulo azimutal ϕ de las funciones generadoras de estos armónicos esféricos [7,10], ya que contienen el factor $\operatorname{sen} m\phi$ y $\cos m\phi$, respectivamente. $P_\ell^m(\cos\theta)$ son las funciones Legendre asociadas del primer tipo con grado ℓ y orden m . El superíndice (1) significa que la dependencia radial $\rho = kr$ se da en términos de la función esférica de Bessel de primer tipo $j_n(\rho) = \sqrt{\pi/2\rho} \mathbf{J}_{n+1/2}(\rho)$. La onda plana incidente se puede expresar como:

$$\mathbf{H}_i = -\frac{k}{\omega\mu} E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} \left(\mathbf{M}_{\mathbf{e1n}}^{(1)} + i\mathbf{N}_{\mathbf{o1n}}^{(1)} \right) \tag{1.15}$$

Los campos interno ($\mathbf{E}_1, \mathbf{H}_1$) y dispersado ($\mathbf{E}_s, \mathbf{H}_s$) resultan:

$$\mathbf{E}_1 = \sum_{n=1}^{\infty} E_n \left(c_n \mathbf{M}_{\mathbf{o1n}}^{(1)} - i d_n \mathbf{N}_{\mathbf{e1n}}^{(1)} \right) \tag{1.16}$$

$$\mathbf{H}_1 = -\frac{k_1}{\omega\mu_1} \sum_{n=1}^{\infty} E_n \left(d_n \mathbf{M}_{\mathbf{e1n}}^{(1)} + i c_n \mathbf{N}_{\mathbf{o1n}}^{(1)} \right) \tag{1.17}$$

y

$$\mathbf{E}_s = \sum_{n=1}^{\infty} E_n \left(i a_n \mathbf{N}_{\mathbf{e1n}}^{(3)} - b_n \mathbf{M}_{\mathbf{o1n}}^{(3)} \right) \tag{1.18}$$

$$\mathbf{H}_s = \frac{k}{\omega\mu} \sum_{n=1}^{\infty} E_n \left(i b_n \mathbf{N}_{\mathbf{o1n}}^{(3)} + a_n \mathbf{M}_{\mathbf{e1n}}^{(3)} \right) \tag{1.19}$$

Donde $E_n = i^n E_0(2n + 1)/n(n + 1)$ y μ_1 es la permeabilidad de la esfera. El superíndice (3) se refiere a los armónicos esféricos vectoriales para los cuales la dependencia radial de las funciones generadoras es especificada por la función esférica de Hankel del primer tipo $h_n^{(1)}$.

Al definir el *parámetro de tamaño* $x = ka$, los coeficientes Mie de los campos interior y dispersado se obtienen de las condiciones $\Delta \mathbf{E} \times \mathbf{m} = \mathbf{0}$ y $\Delta \mathbf{B} \times \mathbf{m} = \mathbf{0}$ resultando en

$$a_n = \frac{\mu m^2 j_n(mx) [x j_n(x)]' - \mu_p j_n(x) [mx j_n(mx)]'}{\mu m^2 j_n(mx) [x h_n^{(1)}(x)]' - \mu_p h_n^{(1)}(x) [mx j_n(mx)]'} \quad (1.20)$$

$$b_n = \frac{\mu_p j_n(mx) [x j_n(x)]' - \mu j_n(x) [mx j_n(mx)]'}{\mu_p j_n(mx) [x h_n^{(1)}(x)]' - \mu h_n^{(1)}(x) [mx j_n(mx)]'} \quad (1.21)$$

interior

$$c_n = \frac{\mu_p j_n(x) [x h_n^{(1)}(x)]' - \mu_p h_n^{(1)}(x) [x j_n(x)]'}{\mu_p j_n(mx) [x h_n^{(1)}(x)]' - \mu h_n^{(1)}(x) [mx j_n(mx)]'} \quad (1.22)$$

$$d_n = \frac{\mu_p m j_n(mx) [x h_n^{(1)}(x)]' - \mu_p m h_n^{(1)}(x) [x j_n(mx)]'}{\mu m^2 j_n(mx) [x h_n^{(1)}(x)]' - \mu_p h_n^{(1)}(x) [mx j_n(mx)]'} \quad (1.23)$$

Construyendo una esfera imaginaria de radio r centrada en la partícula, podemos obtener la sección eficaz de dispersión de una esfera calculando la tasa neta \mathcal{W}_a de energía electromagnética que cruza la superficie A de dicha esfera (ver Figura 1.7)

$$\mathcal{W}_a = - \int_A \langle \mathbf{S} \rangle \cdot \hat{\mathbf{e}}_r dA \quad (1.24)$$

Donde $\langle \mathbf{S} \rangle$ es la densidad de flujo de energía promediada en el tiempo, dada por el promedio temporal del vector de Poynting y $\hat{\mathbf{e}}_r$ es el versor en la dirección r . Dado que el promedio temporal del vector de Poynting $\langle \mathbf{S} \rangle$ en cualquier punto alrededor de la partícula puede ser escrita como la suma de tres términos

$$\langle \mathbf{S} \rangle = \langle \mathbf{S}_i \rangle + \langle \mathbf{S}_s \rangle + \langle \mathbf{S}_{\text{ext}} \rangle \quad (1.25)$$

Donde $\langle \mathbf{S}_i \rangle$, $\langle \mathbf{S}_s \rangle$ y $\langle \mathbf{S}_{\text{ext}} \rangle$ son las densidades de flujo de energía incidente, dispersada y de extinción, respectivamente. Si $\mathcal{W}_a > 0$ la energía es absorbida

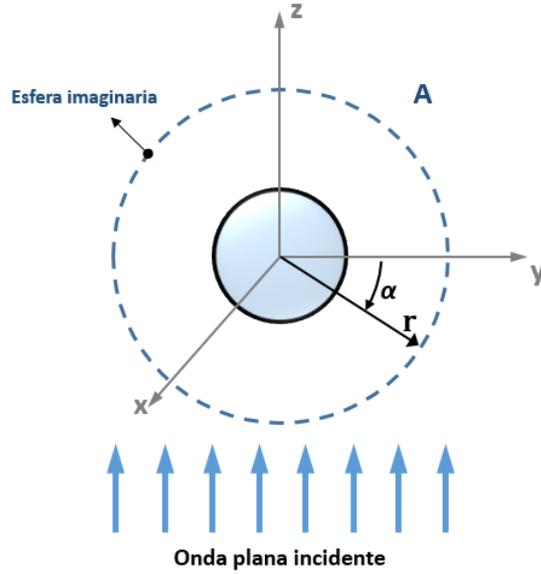


Figura 1.7: Onda plana x-polarizada incidiendo sobre una esfera imaginaria de radio r centrada en la partícula. El medio que rodea la partícula es no absorbente.

dentro de la esfera, dado que el medio es no absorbente \mathcal{W}_a es la tasa a la cual la energía es absorbida por la partícula. Por medio de la ecuación 1.25 podemos escribir \mathcal{W}_a como $\mathcal{W}_a = \mathcal{W}_i - \mathcal{W}_s + \mathcal{W}_{ext}$ donde

$$\mathcal{W}_i = - \int_A \langle \mathbf{S}_i \rangle \cdot \hat{\mathbf{e}}_r dA \quad \mathcal{W}_s = - \int_A \langle \mathbf{S}_s \rangle \cdot \hat{\mathbf{e}}_r dA \quad \mathcal{W}_{ext} = - \int_A \langle \mathbf{S}_{ext} \rangle \cdot \hat{\mathbf{e}}_r dA \quad (1.26)$$

\mathcal{W}_i es la tasa a la cual la energía incide, esta se desvanece puesto que el medio es no absorbente. \mathcal{W}_s es la tasa a la cual la energía es dispersada a través de la esfera A. Por lo tanto, la tasa de extinción de energía \mathcal{W}_{ext} es la suma de la tasa de absorción y la tasa de dispersión de energía

$$\mathcal{W}_{ext} = \mathcal{W}_a + \mathcal{W}_s \quad (1.27)$$

Realizando el cociente de cada una de estas tasas de energía con la irradiancia incidente I_i se obtienen las secciones eficaces de dispersión σ_{sca} , extinción σ_{ext}

y absorción σ_{abs} como

$$\sigma_{sca} = \frac{\mathcal{W}_s}{I_i} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)(|a_n|^2 + |b_n|^2) \quad (1.28)$$

$$\sigma_{ext} = \frac{\mathcal{W}_{ext}}{I_i} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \Re \{a_n + b_n\} \quad (1.29)$$

$$\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{sca} \quad (1.30)$$

Donde \Re significa parte real.

1.3.3. Dispersión de Rayleigh

La dispersión de Rayleigh es la dispersión elástica de la luz por partículas muy pequeñas. Lleva el nombre de Lord Rayleigh (John William Strutt), quien describió el proceso por primera vez alrededor de 1870 y estableció la dependencia de la cantidad de luz reemitida con la longitud de onda de la luz incidente, [16]. Este tipo de dispersión se puede representar en forma de un proceso de dispersión elástica $A + h\nu \rightarrow A' + h\nu$ donde A y A' representan los estados inicial y final de la partícula, respectivamente, que tienen exactamente la misma energía U si la frecuencia del fotón emitido es igual a la frecuencia del fotón incidente, Figura 1.8 [17]. Tanto la energía como el momento se conservan en el proceso de dispersión.

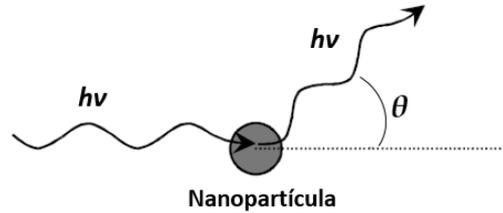


Figura 1.8: Esquema que muestra el proceso de dispersión de Rayleigh. Las flechas onduladas representan la onda incidente (horizontal) y dispersada (en la dirección θ), $h\nu$ es la energía del fotón y θ es el ángulo de dispersión.

1.3. PROPIEDADES OPTICAS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS 17

Este proceso se describe en el cálculo teórico de la interacción de un campo eléctrico oscilante externo y una molécula o un átomo. En general, cuando una onda electromagnética incide sobre un átomo aislado o una molécula pequeña, interacciona con una nube de electrones enlazados, comunicando energía al átomo. Esta energía adicional permite que algún electrón en el nivel más bajo de energía (su estado base) se mueva a un estado excitado. Estos electrones excitados no permanecen en este estado mucho tiempo, sino que regresan a su estado base reirradiando una cierta parte de la energía que absorbieron inicialmente, (ver Figura 1.9).

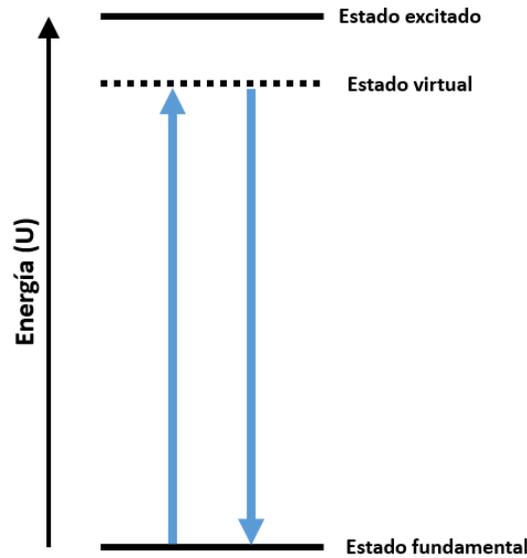


Figura 1.9: Diagrama esquemático de las transiciones de energía involucradas en la dispersión de Rayleigh. La energía del fotón antes y después de la colisión está representada por flechas azules de longitud idéntica. La flecha dirigida hacia arriba comienza exactamente en el nivel de energía en el que se detiene la flecha dirigida hacia abajo, lo que significa que la energía antes y después de la colisión no cambió.

De acuerdo a lo desarrollado en la sección 1.3.2, a partir del comportamiento asintótico de la teoría de Mie considerando partículas de tamaño mucho menor a la longitud de onda, $a \ll \lambda$, se puede obtener la dispersión de Rayleigh de manera analítica. Utilizando las funciones de Bessel esféricas desarrolladas en series de potencia, es posible expandir los coeficientes de dispersión a_n y b_n . Teniendo en cuenta sólo los primeros términos de la expansión y sólo tomando los primeros cuatro coeficientes obtenidos. Se encuentra que si asumimos que $|w|x \ll 1$, entonces $|b_1| \ll |a_1|$ por lo que la intensidad de luz dispersada I_s es [15], [18]

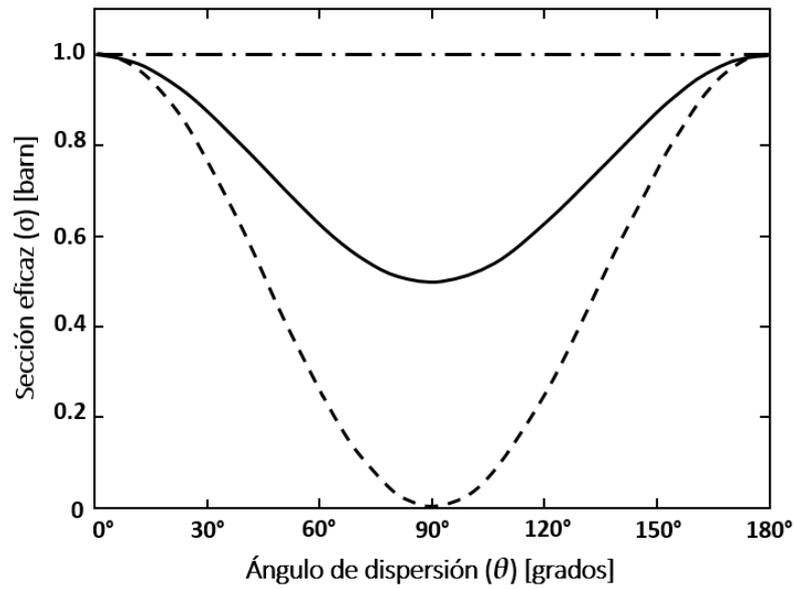
$$I_s = \frac{8\pi^4 N a^6}{r^2 \lambda^4} \left| \frac{w^2 - 1}{w^2 + 2} \right|^2 (1 - \cos^2 \theta) I_i \quad (1.31)$$

Donde w es el *índice de refracción relativo* ($w = n_p/n$).

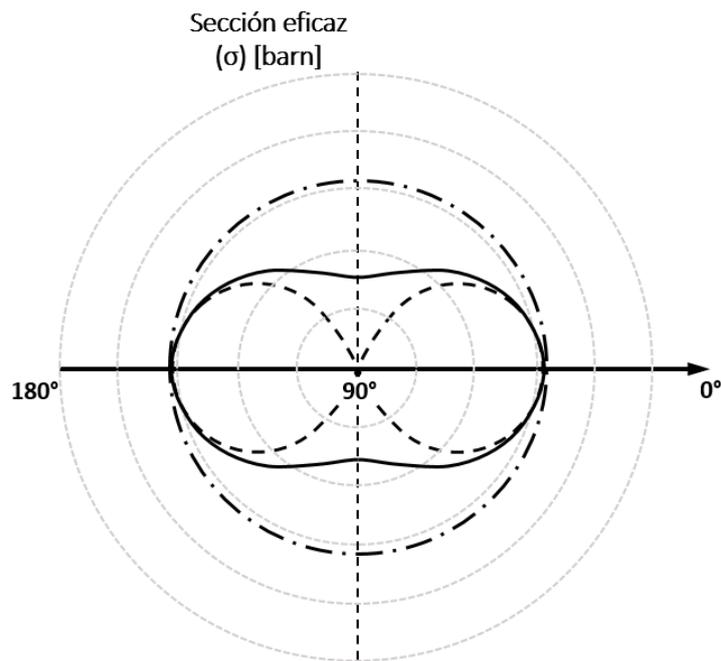
Si la cantidad $|(w^2 - 1)/(w^2 + 2)|^2$ depende débilmente de la longitud de onda (esto no siempre es cierto) la intensidad dispersada por cualquier esfera suficientemente pequeña que cumpla $a \ll \lambda$, es proporcional a $1/\lambda^4$. La ecuación 1.31 se aplica para luz incidente no polarizada. La distribución angular de la luz dispersada depende de la polarización de la onda incidente [15]

$$\begin{aligned} i_{\parallel} &= \frac{9 |a_1|^2}{4k^2 r^2} \cos^2 \theta && \text{Luz incidente polarizada paralela al plano de dispersión} \\ i_{\perp} &= \frac{9 |a_1|^2}{4k^2 r^2} && \text{Luz incidente polarizada perpendicular al plano de dispersión} \\ i &= \frac{1}{2}(i_{\parallel} + i_{\perp}) && \text{Luz incidente no polarizada} \end{aligned}$$

La distribución angular de la luz dispersada (normalizado a la dirección de avance) para las distintas configuraciones de la luz incidente, se muestran en la Figura 1.10.



(a)



(b)

Figura 1.10: Se muestran a) la sección eficaz total y b) la distribución angular (normalizada) de la luz dispersada por una esfera muy pequeña comparada con la longitud de onda ($a \ll \lambda$). Luz incidente polarizada paralela (----) y perpendicular (— · —) al plano de dispersión; luz incidente no polarizada (—)[15].

1.4. Movimiento browniano

Las partículas microscópicas en un fluido se encuentran sometidas a movimientos desordenados y aleatorios productos de la agitación constante de los átomos y moléculas que constituyen la materia del mismo. Estas fluctuaciones de la densidad del fluido resultan en un efecto llamado *Movimiento Browniano*, (ver Figura 1.11). Este efecto fue descubierto en 1827 por el botánico escocés Roben Brown, cuando estaba observando a través de un microscopio partículas de polen en suspensión en un líquido. Las partículas en difusión browniana describen un movimiento zigzagante y la velocidad de las mismas aumenta al disminuir su tamaño y al aumentar la temperatura o al rebajar la viscosidad del medio. El primer modelo cuantitativo de este fenómeno fue desarrollado por Albert Einstein en 1905 [19], e independiente y casi simultáneamente por Marian Smoluchowski [20].

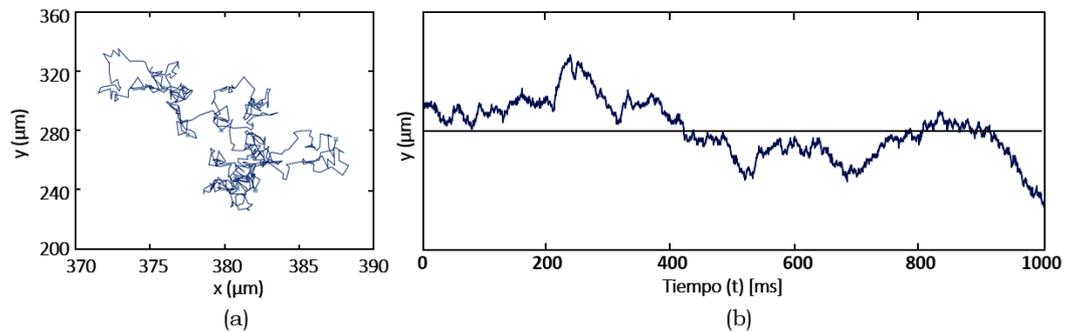


Figura 1.11: a) Ejemplo de trayectoria bidimensional de una partícula que difunde por movimiento browniano. b) Trayectoria unidimensional correspondiente al gráfico espacio/tiempo de la componente y de a).

Einstein consideró que el movimiento irregular de las partículas se debe a las colisiones con las moléculas del fluido en el que están suspendidas y que se encuentran en un estado de equilibrio dinámico. Encontró que el coeficiente de difusión D de la sustancia en suspensión, constituida por partículas esféricas

de diámetro d , depende del coeficiente de viscosidad del líquido η

$$D = \frac{RT}{3\pi\eta d} \quad (1.32)$$

siendo R la Constante Universal de los gases y T la temperatura.

La trayectoria de la partícula a través del microscopio se observa en dos dimensiones, pero no es más que la combinación de dos movimientos idénticos sobre cada uno de los dos ejes, de modo que lo primordial es el análisis del movimiento unidimensional, (ver Figura 1.11). Después, pueden combinarse varios de ellos para estudiar el movimiento browniano en dos y tres dimensiones. Einstein también probó, que la probabilidad $f(x, t)$ de que cada una de las coordenadas de la partícula se haya incrementado en una cantidad x al cabo de un tiempo t , verifica la *ecuación de difusión*

$$\frac{\partial f}{\partial t} = D \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} \quad (1.33)$$

La cual tiene como solución:

$$f(x, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D t}} \exp \left[-\frac{(x)^2}{4D t} \right] \quad (1.34)$$

Teniendo la densidad de probabilidad de la posición y del tiempo podemos calcular el *desplazamiento cuadrático medio* MSD:

$$\langle x^2(t) \rangle = 2Dt \quad (1.35)$$

Otra herramienta ampliamente utilizada para analizar trayectorias de partículas individuales es el espectro de escala de momento (Moment Scaling Spectra, MSS) [21],[22],[23]. En particular para el movimiento con difusión browniana el MSS es 0.5

En el presente trabajo, se analiza el movimiento browniano de nanopartículas (NPs) en suspensión, adquiriendo videos de muestras de las mismas y analizándolos mediante el programa ImageJ utilizando la rutina "Mosaic Single-Particle Tracking Tool" de seguimiento de partículas individuales

(SPT)[24]. La detección automatizada de trayectorias a partir de secuencias de video proporciona una gran cantidad de información que se puede explotar para cuantificar los movimientos de las partículas. El análisis de trayectorias bidimensionales es una técnica bien establecida para determinar los coeficientes de difusión o las velocidades de transporte. El programa permite realizar un análisis cuantitativo, inspeccionar el resultado final de un trabajo de rastreo y analizar las trayectorias con respecto a sus propiedades de movimiento, constantes de difusión [21] o espectros de escala de momento (Moment Scaling Spectra, MSS) [25]. Dicho programa, contiene un algoritmo en el cual estableciendo los parámetros adecuados, proporciona una caracterización sistemática de las trayectorias de las nanopartículas en las películas adquiridas con cualquier técnica de microscopía. Esta herramienta provee una tabla que contiene la información completa del movimiento descrito por cada NPs identificada. El análisis del movimiento se basa en el cálculo de los momentos de desplazamiento. Sea $\mathbf{x}_j(n)$ el vector posición $(x_j(n), y_j(n))$ en la trayectoria j al tiempo $n\Delta t$ para $n = 0, 1, 2, \dots, \mathbf{M}_j - 1$ donde \mathbf{M}_j es le número total de detecciones de puntos en la trayectoria j ; es decir, su longitud. Δt es la diferencia real de tiempo entre dos cuadros subsecuentes en la película adquirida. El momento de *orden* $\nu = 2$ para un cambio de cuadro específico Δn es precisamente el desplazamiento cuadrático medio (MSD):

$$\mu_{2,j}(\Delta n) = \frac{1}{\mathbf{M}_j - \Delta n} \sum_{n=0}^{\mathbf{M}_j - \Delta n - 1} |\mathbf{x}_j(n + \Delta n) - \mathbf{x}_j(n)|^2 \quad (1.36)$$

A partir de esta expresión y la tabla de datos se encuentra la dependencia lineal del MSD con el tiempo. También se consigue graficar cada una de las trayectorias. Utilizando la expresión de la difusión 1.32, se puede determinar el diámetro hidrodinámicos de las NPs

$$d_H = \frac{RT}{3\pi\eta D} \quad (1.37)$$

El diámetro obtenido a partir de este método es el *diámetro hidrodinámico*; es

decir, es el diámetro de una esfera que posee el mismo coeficiente de difusión traslacional que el de la partícula que se mide pero con una capa de solvatación que rodea la misma. Por lo tanto, el diámetro real de las NPs es ligeramente menor que el obtenido mediante esta técnica.

Capítulo 2

Objetivos

2.0.1. Objetivo general

El objetivo principal del presente plan de trabajo fue el desarrollo de un microscopio de campo oscuro digital con capacidad espectral mediante la modificación/ampliación de un microscopio de fluorescencia disponible en la UNRC. La microscopía de campo oscuro es complementaria a la microscopía de fluorescencia, por lo que dichos equipos en sinergia permiten el estudio detallado de materiales nanoestructurados.

2.0.2. Objetivos específicos

- Diseñar y construir el conjunto fuente de luz-condensador-máscara que permita la iluminación adecuada para que el actual microscopio funcione en modo campo oscuro.
- Obtener imágenes de intensidad de dispersión de NPs en modo campo oscuro.
- Obtener distribuciones de diámetros hidrodinámicos de nanopartículas midiendo y analizando su movimiento browniano.

- Obtener espectros de Rayleigh de partículas metálicas individuales.

Capítulo 3

Construcción del microscopio de campo oscuro

En este capítulo se muestra como se llevo a cabo el diseño y construcción del microscopio de campo oscuro. Primero, se da una descripción de las piezas y el equipamiento utilizados para armar el microscopio. Luego, se presenta la elaboración del conjunto de excitación, puesto que este dispositivo es esencial para utilizar el sistema en la modalidad de campo oscuro. Por último, se presenta el esquema del microscopio completo, junto con algunas fotos del mismo.

Componentes

Como se mencionó anteriormente, la construcción del microscopio de campo oscuro se desarrolló a partir de una modificación del microscopio de fluorescencia del Laboratorio de Microscopia óptica Avanzada (LMOA). De hecho, el equipamiento que constituye el sistema de detección es parte del microscopio original. Para componer el resto del microscopio (conjunto de excitación) se emplearon diversos elementos ópticos y mecánicos. Dicho equipamiento fue adquirido a través de proyectos de investigación financiados

28CAPÍTULO 3. CONSTRUCCIÓN DEL MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO

por diversos organismos nacionales (FONCIT y CONCIET), provinciales (MINCyT Córdoba) y locales (SCyT UNRC). Los elementos que constituyen el microscopio desarrollado se describen a continuación:

- Mesa óptica Thorlabs con agujeros de montaje roscados dispuestos en forma de grilla cuadrada. Esta mesa proporciona una base rígida y estable sobre la cual se montan y alinean todos los componentes del microscopio necesarios para obtener la configuración óptica apropiada. La mesa posee una estructura interna particular que permite amortiguar las vibraciones causadas por partes motorizadas dentro del experimento. Se encuentra montada sobre soportes neumáticos que permiten aislar el sistema óptico de las vibraciones del suelo en un rango de frecuencia entre 10 y 50 Hz, puesto que dichas vibraciones podrían alcanzar a los elementos ópticos afectando la calidad de las imágenes del microscopio mediante el ruido inducido por la vibración.
- Componentes ópticos (filtros, espejos, prismas, lentes, objetivos de alta performance, polarizadores, etc.) y soportes para componentes ópticos (fijos y ajustables). Los componentes ópticos influyen directamente en la calidad de las imágenes, estos elementos deben poseer un alto grado de calidad y funcionamiento, tener una excelente transmitancia (o reflectancia en caso de espejos) con el fin de reducir la pérdida de luz en cada refracción o reflexión. En particular, los lentes utilizados en el conjunto de excitación deben tener un alto nivel de corrección de aberraciones ópticas. Esto es necesario para obtener imágenes nítidas y confiables.

El lente objetivo utilizado es marca Nikon, magnificación = 20x y apertura numérica $NA = 0.45$. Este se emplea para coleccionar la luz proveniente de la muestra. Su apertura numérica es menor al del lente

condensador ($NA=0.79$) que conforma el conjunto de excitación, puesto que es una condición necesaria para que funcione el microscopio.

Los componentes mecánicos proporcionan estabilidad al microscopio y mantienen los elementos ópticos correctamente alineados. Los componentes ajustables, en general, están conformados por tornillos micrométricos puesto que proporcionan movimientos de gran precisión.

- Cámara de multiplicación de electrones (EM-CCD) Andor iXon. Con eficiencia de detección $> 93\%$ a ~ 600 nm, 512×512 pixeles, digitalizador de 10 MHz, enfriamiento termoeléctrico hasta $-80^\circ C$ y obturador incorporado. Este equipo se emplea para la detección de luz y posee un alto rendimiento para las aplicaciones más exigentes con poca luz. El CCD de multiplicación electrónica (EM-CCD) funciona por amplificación (ganancia EM) de eventos de señal débil a un nivel de señal que está bien alejado del ruido de lectura de la cámara a cualquier velocidad de lectura. Este modo proporciona a la cámara un aumento de sensibilidad, permitiendo a la misma la detección de fotones individuales.
- Computadora de alto rendimiento dedicada al control de la cámara EM-CCD, adquisición y procesamiento de imágenes por medio de una Tarjeta de interfase. El equipo se maneja a través de un software de adquisición de imágenes provisto por el fabricante.
- Espectrógrafo de imagen Shamrock 303i con red de difracción de baja resolución y alta eficiencia en el rango espectral de $\sim 450-900$ nm. Los espejos y redes de difracción del espectrógrafo están corregidos para disminuir astigmatismo en las imágenes y espectros generados.

El camino óptico de detección es el mismo del microscopio del Laboratorio de Microscopia óptica Avanzada (LMOA). Brevemente dicho camino cuenta con elementos ópticos (espejos y lente tubo) que direccionan y enfocan la luz

colectada por el objetivo para formar una imagen sobre el chip de la cámara EM-CCD o alternativamente dirigir el haz colectado al espectrógrafo de imagen acoplado a la misma cámara EM-CCD para dispersar la luz colectada y obtener espectros de dispersión de Rayleigh de partículas individuales.

3.1. Elaboración del conjunto de excitación

La Figura 3.1 muestra el esquema del conjunto de excitación del microscopio de campo oscuro. La confección del conjunto de excitación se realizó utilizando piezas (marca Thorlabs) de rosca interna. En dicho dispositivo van dispuestas la fuente de luz y el lente condensador. Como se mencionó anteriormente, dicho conjunto permite iluminar la muestra de forma que sólo la luz dispersada por la misma llegue al objetivo, formando así una imagen de alto contraste donde la muestra aparece brillante y contrasta contra un fondo negro.

Para componer la fuente cuasi-puntual se empleó un diodo emisor de luz blanca (LED) pequeño (1x1 mm). Dicho LED se obtuvo a partir de una tira LEDs, y no posee una cápsula protectora/lente acoplado dado que este revestimiento plástico prodría distorsionar el espectro de emisión y su patrón espacial de intensidad. El LED está montado sobre un disco pintado de negro dentro de un anillo roscado, lo cual permite acercarlo o alejarlo del lente colector según sea necesario. Contiguo al LED, se colocó una máscara conteniendo una perforación circular pequeña ($\sim 0.5\text{mm}$) para mejorar la puntualidad en la emisión de la fuente, ver Figura 3.1. El LED se encuentra acoplado a una batería de 9V (que actúa como fuente eléctrica continua estabilizada) a través de un circuito de regulación de corriente en un rango de $95 - 300\mu\text{A}$ que fue diseñado y ensamblado con componentes comerciales simples y de fácil adquisición. El circuito permite controlar con precisión la

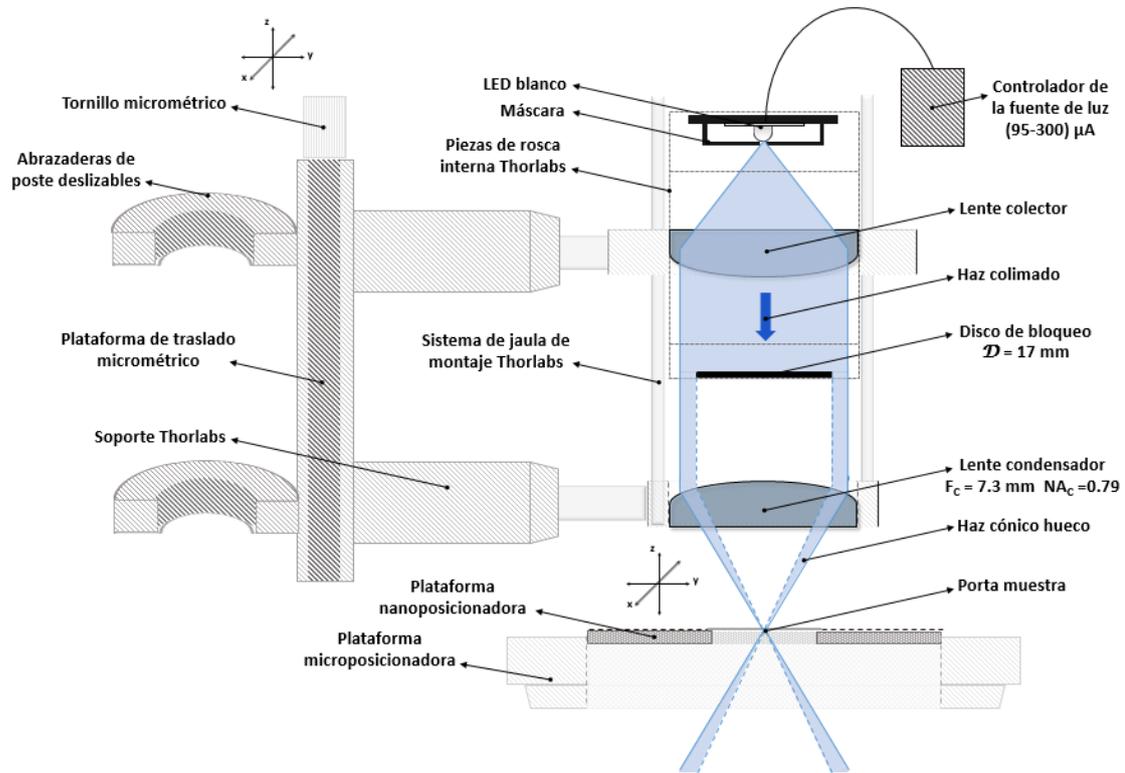


Figura 3.1: Esquema del conjunto de excitación del microscopio de campo oscuro y estructura del soporte diseñado para para contener y ubicar dicho sistema. El conjunto de excitación se armó empleando piezas con rosca interna dispuestas dentro de un sistema de jaula de montaje. Dicha jaula esta acoplada a una plataforma de traslado micrométrico, la cual se fija a un poste por medio de dos abrazaderas y proporciona un movimiento preciso (vertical respecto al plano de la muestra) permitiendo hacer el foco fino sobre la muestra.

intensidad lumínica producida por el LED, Figura 3.2.

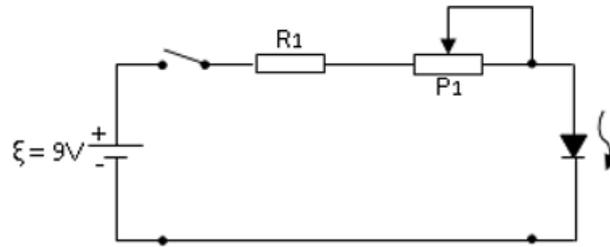


Figura 3.2: Esquema del circuito de regulación de corriente desarrollado para la fuente cuasi-puntual del conjunto de excitación.

Para el desarrollo del condensador, primero se determinó la dimensión que debía tener el disco opaco para optimizar el funcionamiento del microscopio. Puesto que en un principio se buscó que el microscopio sea funcional para un lente objetivo de magnificación = 40X (Reichert, $NA = 0.66$), el diámetro del disco se obtuvo considerando la apertura numérica de este elemento óptico. De esta manera, empleando la ecuación 1.3 y teniendo en cuenta que la distancia focal del lente condensador ($f = 7,3 \text{ mm}$), se encontró que el diámetro del disco debía ser mayor a 12.83 mm. Por tal motivo, se escogió un disco de bloqueo que posee un diámetro de 17 mm. Dicho elemento fue pintado de negro para reducir cualquier posible reflexión en el mismo y se adhirió a un cubre objetos de vidrio montado en una pieza roscada Thorlabs. Luego fue ubicado entre las lentes colector y condensador realizando así el bloqueo central del haz.

Como se mencionó anteriormente el conjunto de piezas se ensambló en un soporte construido a partir de piezas Thorlabs con rosca interna contenidas en un sistema de jaula de montaje, lo que permitió ubicar concéntricamente los distintos elementos ópticos (LED, lente colector, disco opaco, lente condensador) y ajustar la distancia relativa entre ellos para lograr la iluminación deseada. Esta estructura esta montada sobre una plataforma de traslado micrométrico, que se fija a un poste de aluminio solido ($d=2$ pulgadas) por medio de dos abrazaderas deslizantes y proporciona un movimiento preciso

en dirección vertical respecto al plano de la muestra permitiendo ajustar adecuadamente la iluminación del haz incidente.

3.2. Estructura del microscopio

El arreglo espacial del camino óptico está fijo, de manera que es funcional para las distintas modalidades de operación que dispone el microscopio. En cuanto al condensador, como se indicó en la sección 3.1 está montado en un poste, situado de manera que este alineado con el lente objetivo. El esquema del sistema se representa en la Figura 3.3.

Por último, en las Figura 3.4 y 3.5, se exhiben algunas fotografías del microscopio, identificando en las mismas algunos de los componentes mencionados anteriormente.

34CAPÍTULO 3. CONSTRUCCIÓN DEL MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO

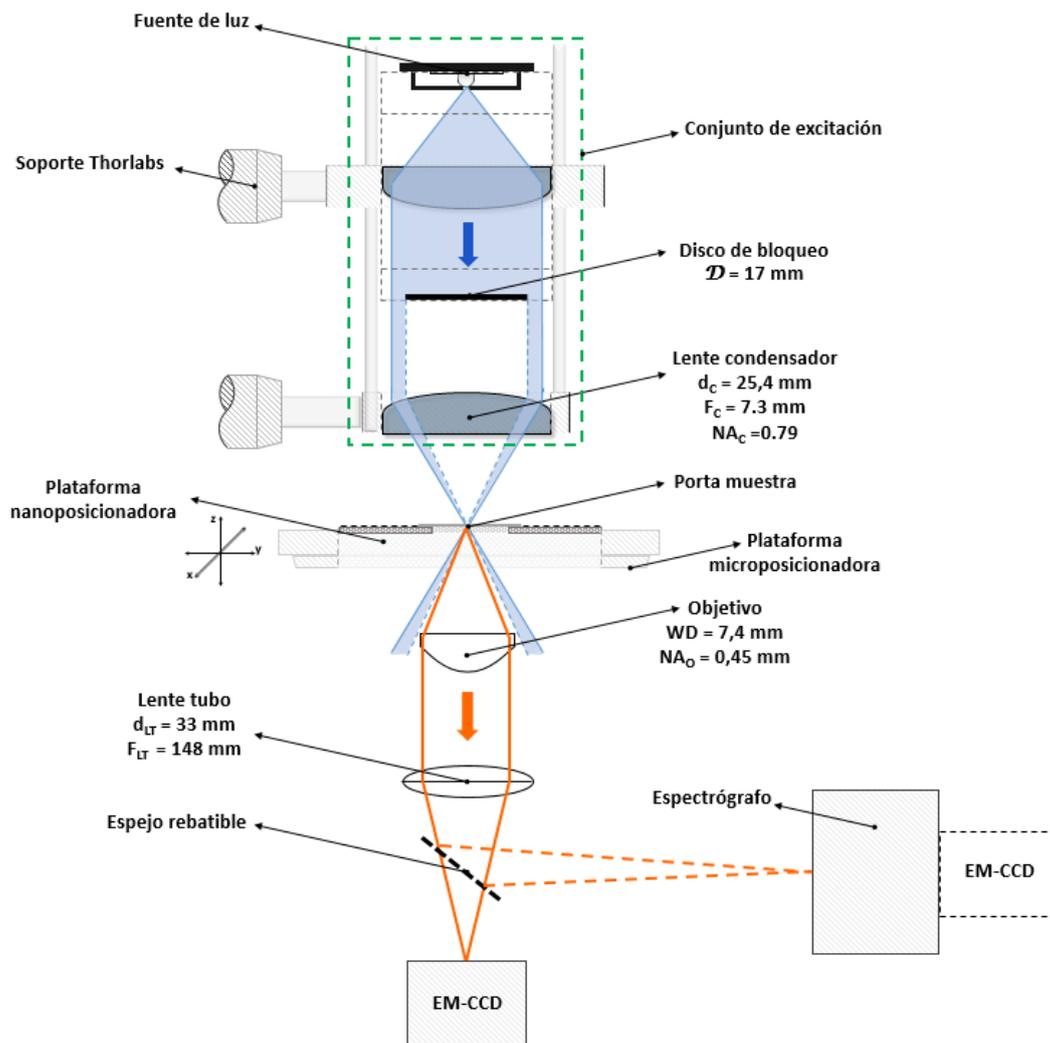


Figura 3.3: Esquema del microscopio de campo oscuro con capacidad espectral.

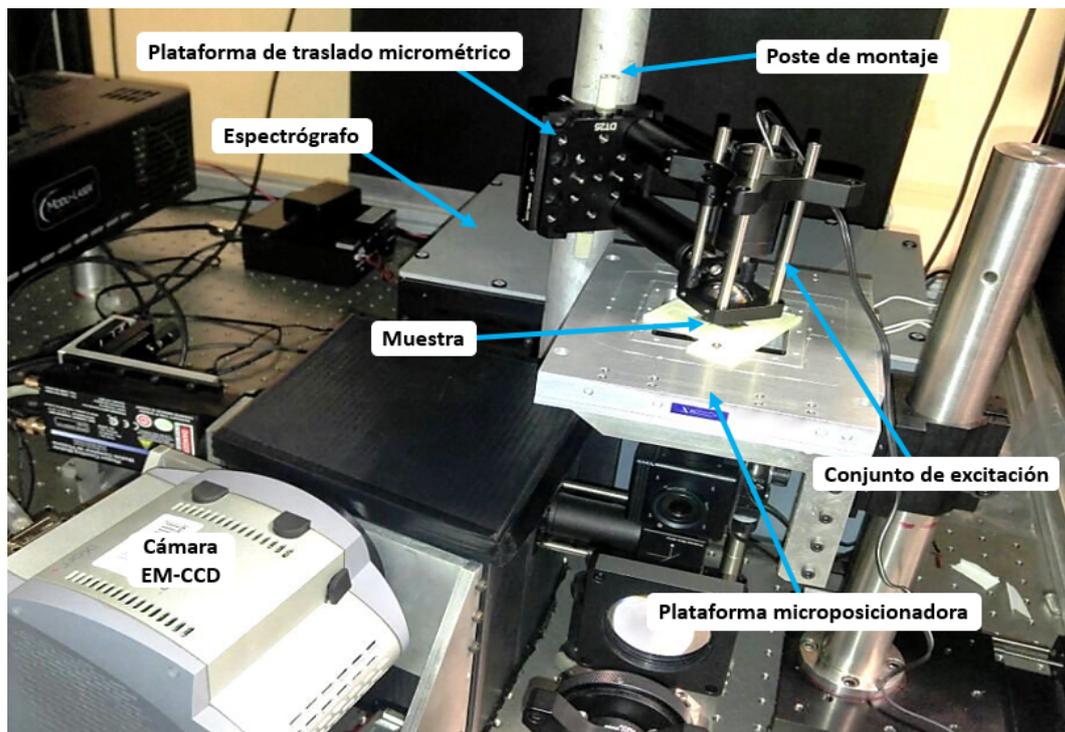
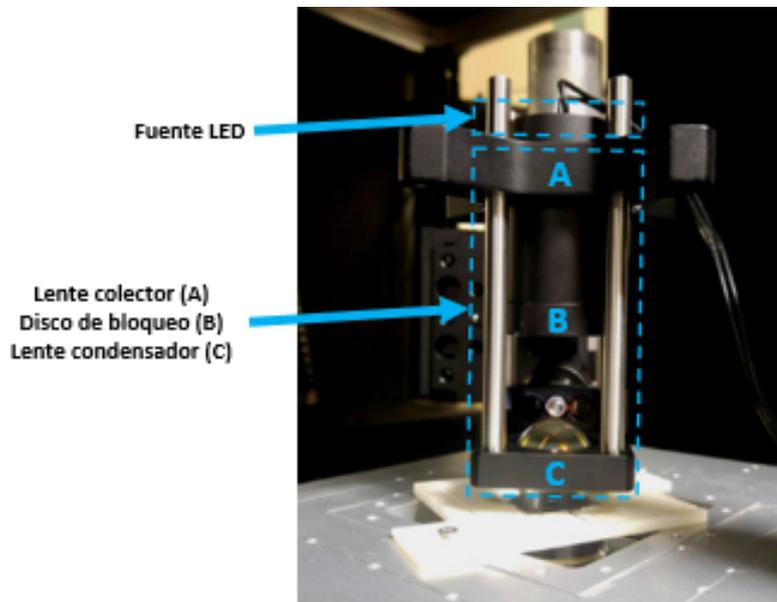


Figura 3.4: Fotografía de la disposición de los componentes del microscopio de campo oscuro. En la imagen se puede apreciar la configuración típica del microscopio, donde el condensador se encuentra alineado con el objetivo.



(a)



(b)

Figura 3.5: a) Fotografía del conjunto de excitación (fuente LED, lente colector, disco de bloqueo y lente condensador) colocado sobre la muestra. b) Fotografía del controlador de la fuente LED (área emisiva $\sim 1 \times 1\text{mm}$).

3.3. Utilización del microscopio

En primer lugar se coloca el lente objetivo Nikon CFI SUPER PLAN FLUOR ELWD 20X con apertura numérica 0.45 y se inicia el programa Andor Solis que controla la cámara EM-CCD. Se enciende el enfriador termoeléctrico que posee la cámara y se establece la temperatura de la misma a -80° .

Luego, se prepara una muestra con una suficiente densidad de nanopartículas por unidad de área alta ($2 \text{ NPs}/\mu\text{m}$) depositando $50 \mu\text{L}$ de NPs en suspensión sobre un coverslip limpio utilizando el método de drop coating. Dicha muestra, es utilizada para determinar el foco del lente objetivo en modo campo amplio (usando la iluminación ambiente). A continuación, se coloca el conjunto de excitación de campo oscuro alineándolo cuidadosamente con el objetivo. Utilizando la fuente en su máxima intensidad ($\sim 300 \mu\text{A}$), se acerca el condensador a la muestra y por medio de la imagen observada en la cámara se determina la posición de excitación adecuada. Acercando el condensador al lente objetivo se alcanzará un punto donde aparecerá un círculo brillante en el campo de visión, como se ilustra en la Figura 3.6 (a). Mientras el condensador sube o baja ligeramente, aparecerá una mancha oscura similar a la que se muestra en la Figura 3.6 (b), si el condensador está correctamente centrado. En los casos en que el condensador no esté correctamente alineado y centrado, un campo de visión típico podría verse como el que se muestra en la Figura 3.6 (c). La posición ideal y correcta del condensador se ilustra en la Figura (a).

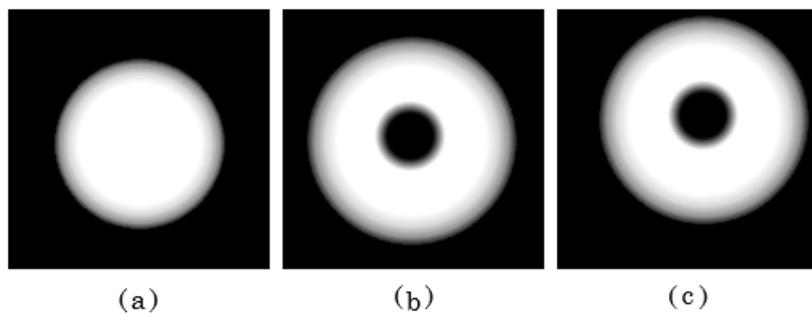


Figura 3.6: Imágenes correspondientes a distintas configuraciones del campo de visión de campo oscuro en función de la alineación y enfoque del condensador. a) Posición ideal y correcta del condensador. b) El condensador está alineado en el plano (x,y) respecto al eje óptico del lente objetivo pero no está en foco (en la posición z) respecto a la muestra. c) El condensador no está alineado con en el eje óptico del objetivo (plano x,y) y además está fuera de foco (en la dirección z) respecto a la muestra.

Capítulo 4

Resultados

En este capítulo, se muestran los resultados obtenidos a partir del microscopio de campo oscuro construido. Se exhiben las imágenes adquiridas por medio de esta técnica y las diferentes caracterizaciones que se llevaron a cabo para probar la capacidad del microscopio.

4.1. Adquisición de imágenes

4.1.1. Preparación de la muestra

Es imperativo que los cubreobjetos (coverslips) utilizados en los procedimientos de microscopía de campo oscuro estén extremadamente limpios. La preparación de los vidrios cubreobjeto es de gran importancia puesto que cualquier sustancia en su superficie produce dispersión de luz que contribuye a la luminosidad del fondo, generando imágenes confusas puesto que se dificulta identificar la muestra de interés (por ejemplo, NPs) y reduciendo la calidad general de la imagen. Por tal motivo, los vidrios cubre objetos se limpiaron siguiendo un procedimiento que emplea una mezcla de ácido sulfúrico (15 mL de H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (5 mL de H_2O_2). Esta solución permite eliminar residuos orgánicos de la superficie del vidrio y además,

provoca que el vidrio sea hidrófilo, lo que facilita depositar muestras a partir de soluciones acuosas por spin coating en el mismo, y permitiendo una distribución más homogénea de la muestra. La figura 4.1 exhibe una muestra de NPs de poliestireno de diámetro $d = (220 \pm 6) \text{ nm}$ depositadas sobre un coverslip cuya superficie no estaba tratada con el método descrito anteriormente. Se observa que la distribución de NPs es poco homogénea.

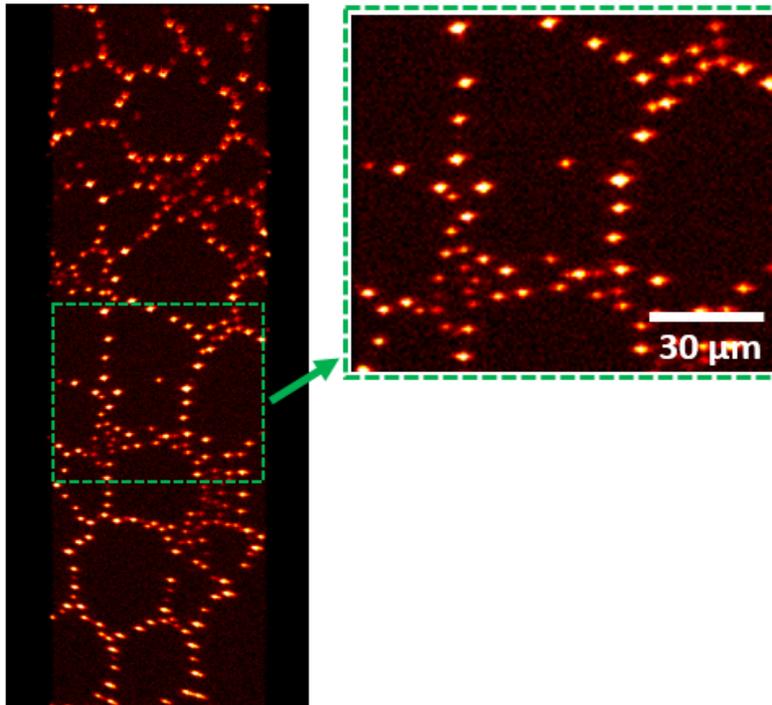


Figura 4.1: Imagen de campo oscuro de NPs de poliestireno sin el tratamiento de limpieza.

Las muestras de NPs se prepararon empleando el método de spin coating. Esto consiste en depositar $50 \mu\text{L}$ de una suspensión de NPs de una concentración determinada en el centro de la superficie del coverslip limpio, para luego hacerlo girar inmediatamente. Este método logra una concentración de NP relativamente uniforme en la superficie del cubre objetos cuando dicha superficie ha sido limpiada correctamente como se mencionó anteriormente.

La concentración de las NPs en suspensión usada varía según el tipo de nanopartículas a depositar. Para obtener la concentración deseada en cada muestra, se prepararon distintas diluciones y se fueron adquiriendo imágenes de campo oscuro de las mismas, (ver Figura 4.2).

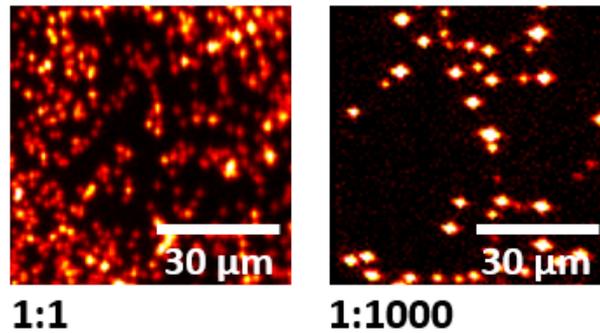


Figura 4.2: Imagen de campo oscuro de NPs de poliestireno en distintas concentraciones.

4.1.2. Imágenes de campo oscuro

Las primeras imágenes que se adquirieron fueron de muestras con nanopartículas de poliestireno de (220 ± 6) nm de diámetro (Figura 4.3). Dichas partículas, posteriormente se utilizaron para realizar una caracterización de su tamaño analizando sus trayectorias de difusión brownianas (sección 4.2). Luego, se adquirieron imágenes de NPs de oro con una monocapa de albúmina y dopadas con bodipy ($d \approx 30$ nm) y NPs de oro ($d = (80 \pm 2)$ nm), (ver Figuras 4.4 y 4.5). En todas las adquisiciones se observaron imágenes de las partículas “brillando” sobre un fondo oscuro. La configuración de operación de la cámara EM-CCD (principalmente grado de amplificación y tiempo de integración por cuadro) y la intensidad de la fuente de excitación LED son ajustas individualmente para cada muestra de manera tal de estar lejos de la

saturación de la cámara.

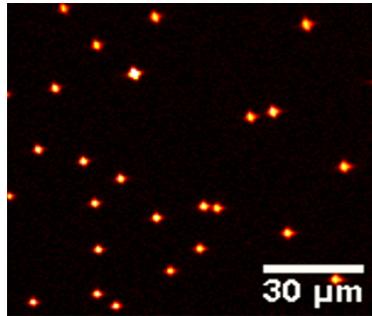


Figura 4.3: Imagen de campo oscuro de NPs de poliestireno ($D = 220 \pm 6$ nm) depositadas en un cobre objeto.

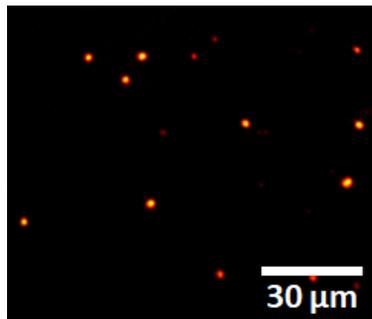


Figura 4.4: Imagen de campo oscuro de nanopartículas de oro con Albumina y bodypi ($D \simeq 30$ nm).

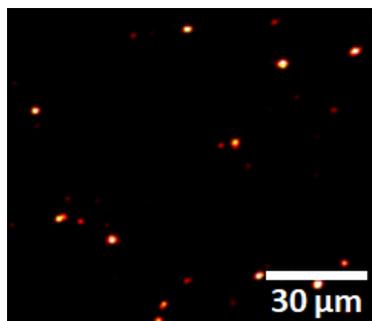


Figura 4.5: Imagen de campo oscuro de nanopartículas de oro ($D = 80$ nm).

4.2. Determinación del tamaño de NPs de poliestireno

Con el objetivo de continuar comprobando el desempeño del microscopio se determinó el diámetro hidrodinámico de NPs de poliestireno mediante el análisis de su movimiento browniano en agua. La Figura 4.6 muestra en detalle la disposición de los elementos ópticos para adquirir videos de NPs difundiéndose en suspensión. Se confeccionaron cámaras compuestas por dos coverslips separados mediante un espaciador (cinta doble faz) con el fin de contener una suspensión de NPs de concentración adecuada en agua. Dichas cámaras se armaron minuciosamente, evitando que se formen burbujas en su interior ya que estas podrían inducir movimientos no brownianos. Previo a realizar la adquisición de los videos, se configuró el microscopio de manera que el foco se ubicó en una región intermedia alejado de ambas superficies del vidrio.

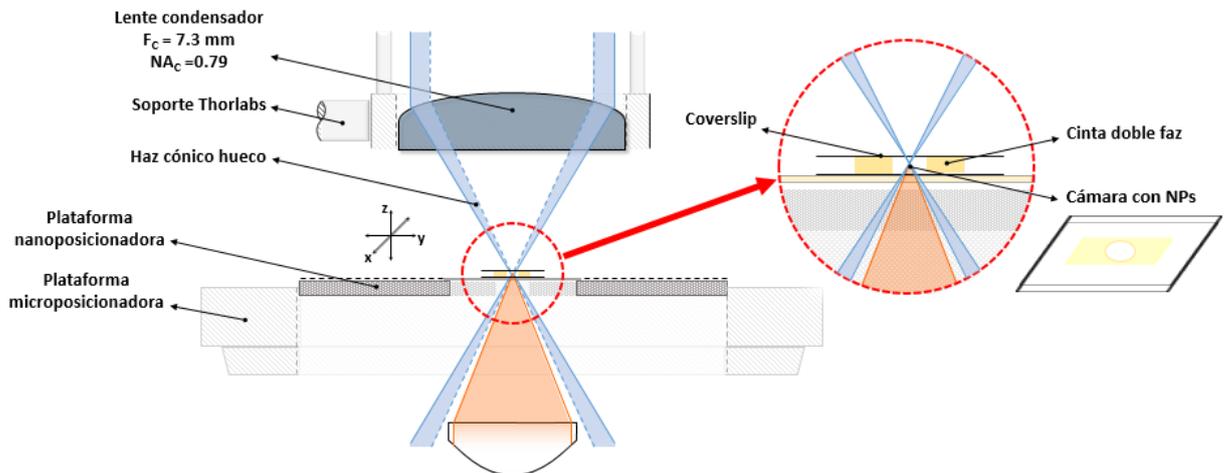


Figura 4.6: Configuración del microscopio para adquirir videos de NPs difundiéndose en suspensión. En la figura se muestran las cámaras armadas para contener las NPs en suspensión.

El análisis de las películas se realizó como se mencionó anteriormente por medio del programa ImageJ utilizando la rutina "Mosaic Single-Particle Tracking Tool" ([24]). A partir de las tablas de datos obtenidas, considerando aquellas trayectorias que contaban con más de 100 puntos (estadísticamente relevantes) y que cumplen con un $MSD \sim 0.5$ ($0,4 < MSD < 0,6$), se obtuvieron los gráficos de las trayectorias y los MSD de cada una, Figura 4.7. Un simple vistazo a los gráficos conseguidos demuestra el movimiento aleatorio de las NPs de poliestireno. Además, de acuerdo con lo esperado el MSD tiene una dependencia lineal con el tiempo, lo que demuestra que la difusión es efectivamente browniana.

Dado que las nanopartículas describen un movimiento browniano, por medio de la ecuación 1.37 se determinó el diámetro hidrodinámico de las NPs de poliestireno. En la Figura 4.8 se presenta un histograma con la distribución de los diámetros hidrodinámicos obtenidos.

El diámetro hidrodinámico obtenido fue $d_H \simeq 300$ nm. El valor medido difiere del tamaño informado por el fabricante. Esto puede deberse a varios factores: a) el valor real indica el diámetro en seco que es menor al diámetro hidrodinámico, aunque es de esperar que la capa de solvatación aparente no sea mayor a 1 nm. b) el lente objetivo utilizado provee una resolución espacial al equipo de ~ 720 nm (tamaño del pixel). Dicho tamaño es mayor al desplazamiento cuadrático medio (MSD) promedio de las NPs durante el tiempo entre dos cuadros consecutivos dificultando la determinación precisa de los coeficientes de difusión y por ende del tamaño de las NPs en estas condiciones de adquisición. Para superar este problema es posible en principio obtener imágenes a mayor velocidad de captura (menor tiempo entre cuadros consecutivos). Debido a restricciones de tiempo no se pudo realizar este experimento.

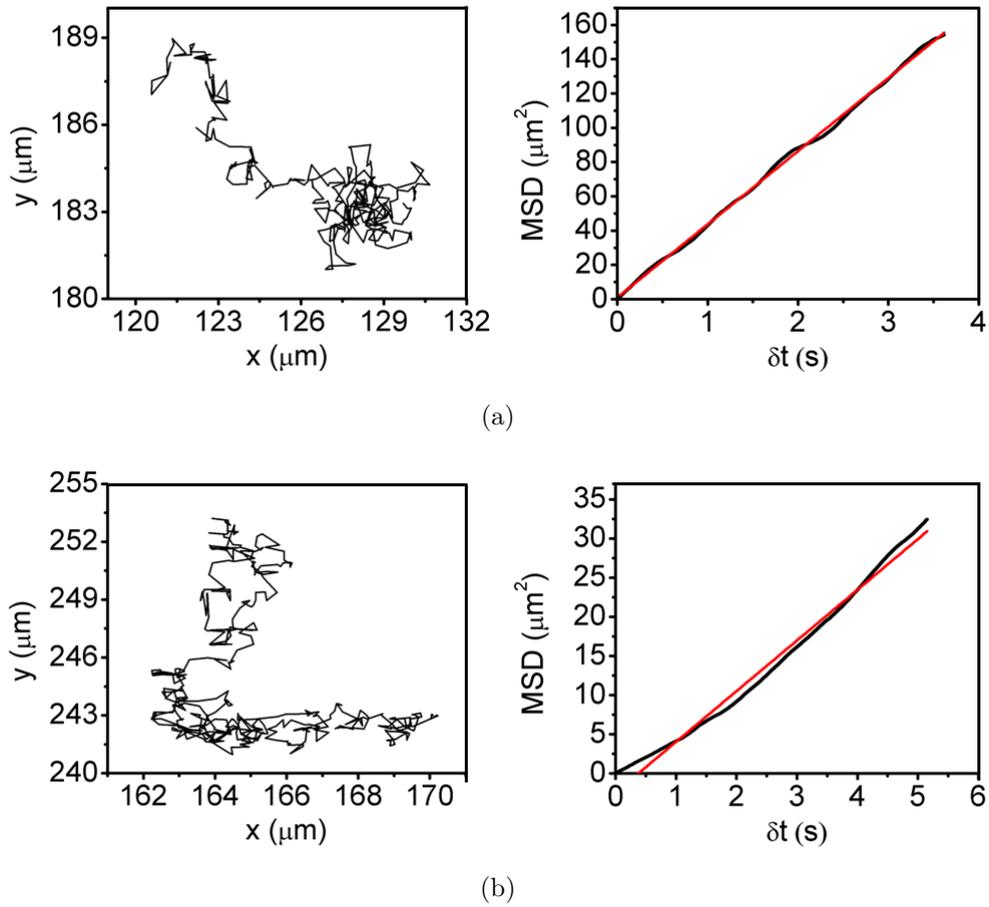


Figura 4.7: Ejemplo de trayectorias bidimensionales (columna izquierda) y correspondientes gráficos MSD vs delta t (columna derecha) de nanopartículas individuales (filas a y b). En la columna derecha las trazas negra y roja corresponden a datos experimentales y su ajuste lineal, respectivamente.

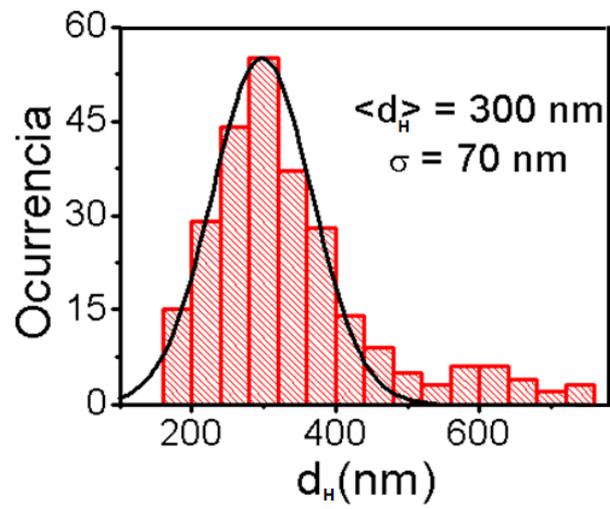


Figura 4.8: Histograma de la distribución de diámetros hidrodinámicos de NPs de poliestireno. El diámetro hidrodinámico obtenido fue $d_H \simeq 300 \text{ nm}$.

4.3. Caracterización espectral

4.3.1. Cálculo de la potencia dispersada

La Figura 4.9 muestra un esquema detallado de la relación angular de dispersión. La apertura numérica (NA) es un número que describe el ángulo del cono de luz que utiliza (colecta o enfoca) un lente. Como se mencionó anteriormente, las aperturas numéricas del lente condensador NA_C y del lente objetivo NA_O determinan los ángulos de incidencia del haz α y de colección de luz dispersada β , ecuaciones 1.1 y 1.2. Además, considerando el diámetro del disco de bloqueo ($(D) = 17mm$) y la distancia focal del lente condensador \mathcal{F}_C podemos conocer el ángulo α' . A partir de estos ángulos es posible obtener el rango angular de la dispersión producida por la muestra:

$$\theta_1 = \alpha - \beta \quad (4.1)$$

$$\theta_2 = \alpha + \beta \quad (4.2)$$

Donde θ_1 y θ_2 indican los extremos de la región angular de adquisición.

Asumiendo que la luz blanca del LED (no polarizada) incide como una onda plana sobre la muestra (partículas de oro), se calculó el espectro de dispersión de una partícula de oro de 80 nm de diámetro por medio de la teoría de Mie (Figura 4.10). Puesto que el problema presenta simetría de rotación azimutal, la potencia dispersada σ_{sca} como función de la longitud de onda que es colectada por el objetivo se calculó integrando la sección eficaz diferencial de dispersión $I(\lambda, \theta)$ entre los ángulos θ_1 y θ_2 [18], [15]

$$\sigma_{sca}(\lambda) = \int_{\theta_1}^{\theta_2} I(\lambda, \theta) d\theta \quad (4.3)$$

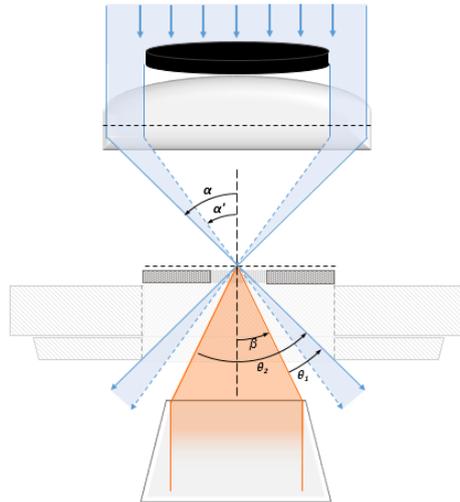


Figura 4.9: Esquema detallado de la relación angular de dispersión. Aquí, α y α' son los ángulos de incidencia máximo y mínimo del haz, β es el ángulo de colección de luz dispersada y θ_1 y θ_2 indican los extremos de la región angular de adquisición.

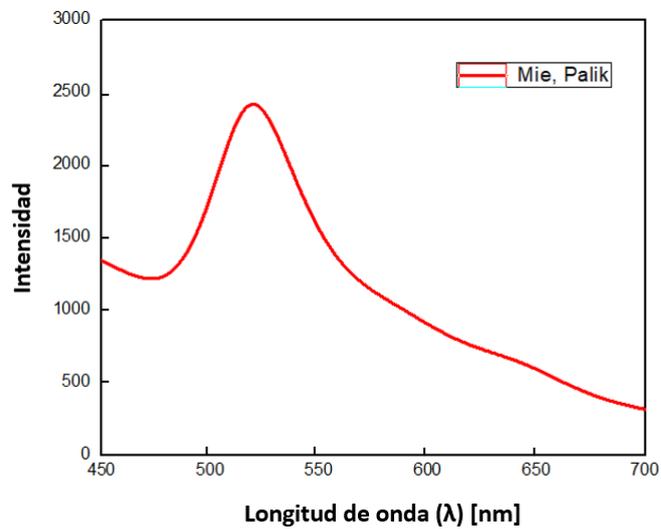


Figura 4.10: Curva de la potencia dispersada obtenida a partir de la teoría de Mie para NPs de oro de 80 nm.

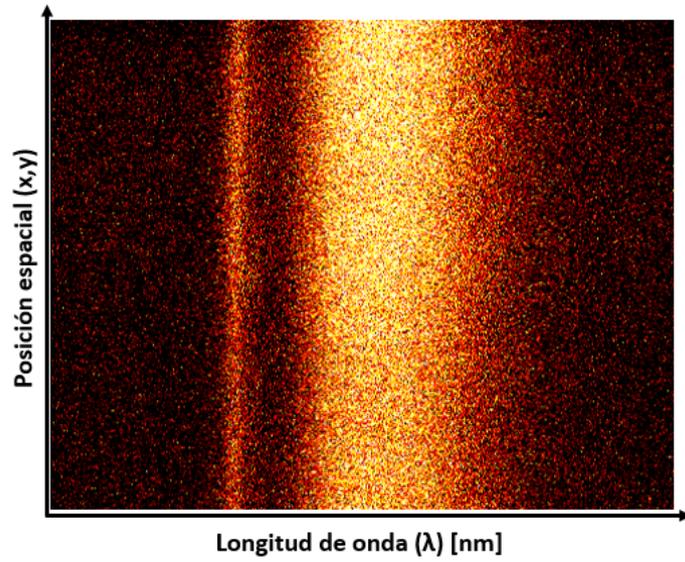
4.3.2. Adquisición de espectros

La adquisición de información espectral se obtuvo redirigiendo (con un espejo plegable) la ruta de recolección del microscopio y enfocándola en la rendija de entrada de un espectrógrafo de imágenes (Andor, Shamrock 303i), acoplada con un detector (cámara EM-CCD) en la rendija de salida. El espectrógrafo se calibró mediante un espectro patrón adquirido con luz ambiente y un ancho de rendija de $50 \mu\text{m}$.

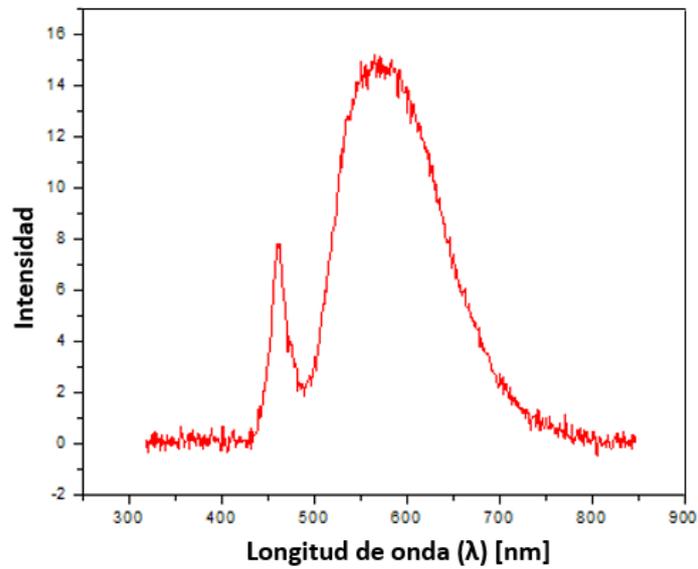
El primer espectro que se adquirió fue el espectro de emisión del LED $L(\lambda)$, el mismo se muestra en la Figura 4.11b. Para esto, se aumentó la intensidad del LED ($300 \mu\text{A}$) y se utilizó el microscopio de campo oscuro sin poner una muestra en el porta objetos. Se ubicó el conjunto de excitación de manera que estaba desenfocado con la lente objetivo, permitiendo coleccionar parte de la luz incidente por dicho objetivo. Utilizando un ancho de rendija de $100 \mu\text{m}$, la cámara en modo multiplicación de electrones (ganancia 1000, tiempo de exposición 1, frecuencia 1 Hz, número de imágenes 100) se obtuvieron los datos de la imagen espectral del LED, Figura 4.11a.

Bajo las mismas condiciones, con el LED apagado, se adquirió el espectro de fondo $B_L(\lambda)$ (cuentas oscuras).

Los datos fueron analizados por medio del programa ImageJ. Con el archivo (en formato .tif) abierto en dicho programa, primero se tomó el promedio de las imágenes adquiridas (100 imágenes), luego seleccionando la imagen resultante con un recuadro se realizó la suma de los perfiles horizontales de intensidad para las distintas alturas (suma en el eje y) y se obtuvo el espectro del LED.



(a)



(b)

Figura 4.11: a) Imagen espectral resultado del promedio de intensidad de las imágenes adquiridas por el microscopio de campo oscuro del espectro de emisión del LED. b) Espectro de emisión del LED obtenido del análisis de datos realizado con el programa ImageJ a partir de la imagen mostrada en a)

4.3.3. Adquisición de espectros de NPs de oro

Los espectros de NPs de oro se adquirieron utilizando un ancho de rendija de entrada al espectrógrafo de $1500 \mu m$ (correspondiente a 72000 nm en de plano de la muestra), lo que permitió obtener un mayor número de espectros de partículas por cada imagen espectral y reducir el tiempo de medición. Por este motivo, para cada conjunto de datos se adquirió una imagen de campo oscuro donde se encuentran las posiciones de las NPs (tomada con el propio espejo del espectrómetro) y la imagen espectral correspondiente a esas NPs. Estos datos también fueron analizados por medio del programa ImageJ. Nuevamente, se tomó el promedio de intensidad de las imágenes adquiridas (100 imágenes). Luego, para cada nanopartícula, se seleccionaron y sumaron todas las líneas espectrales (I, y, λ) que corresponden a una misma nanopartícula para obtener el espectro de dispersión medido $R(\lambda)$ de dicha partícula. como se muestra en la Figura 4.12a. Para cada $R(\lambda)$ se determinó un fondo local $B_R(\lambda)$, que se obtuvo sumando idéntica cantidad de líneas espectrales a ambos lados de los límites de $R(\lambda)$ en forma simétrica, tal como se muestra en la Figura 4.12b. El espectro de dispersión medido de una nanopartícula es una convolución lineal del espectro de dispersión, el espectro de la fuente de iluminación y la respuesta del instrumento. En particular la fuente de excitación LED no tiene una salida espectral plana (Figura 4.11). Así mismo, la transmitancia de los distintos elementos en el camino óptico y la eficiencia de detección de la EM-CCD también muestran dependencia (no lineal) con λ . Debido a esto, los espectros de campo oscuro obtenidos experimentalmente se corrigieron de acuerdo con [26]

$$N_p(\lambda) = \frac{R(\lambda) - B_R(\lambda)}{L(\lambda) - B_L(\lambda)} \quad (4.4)$$

Siendo $N_p(\lambda)$ el espectro de dispersión de la partícula, $L(\lambda)$ el espectro del LED y $B_L(\lambda)$ las cuentas oscuras (obtenidas cuando no incide luz sobre el chip de la cámara).

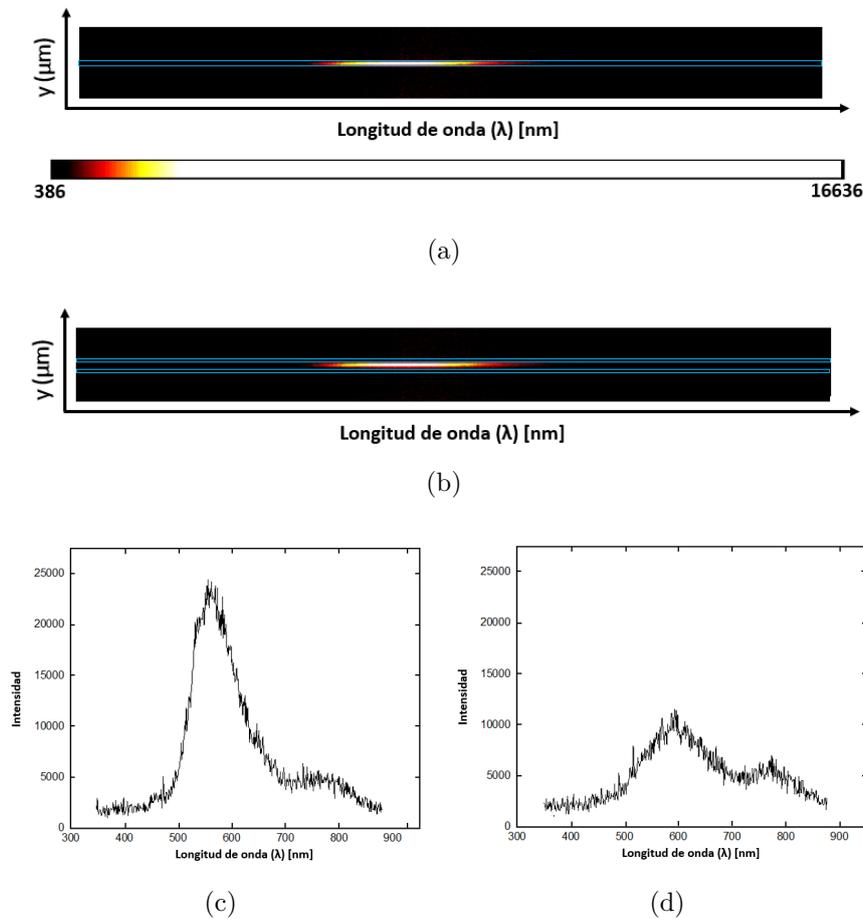


Figura 4.12: a) Esta figura muestra como se realiza la suma de los perfiles horizontales en y de las NPs de oro de 80 nm de diámetro. Luego de realizar la selección, por medio de un comando (ctrl + K) se obtiene el gráfico del espectro a partir del cual se consiguen los datos. Bajo esta se encuentra una guía de colores que indica intensidad relativa de I (intensidad dispersada). b) Esta imagen muestra como se adquiere el fondo local para cada NPs. Se selecciona el fondo a ambos lados de la línea intensa, procurando que la suma del área encerrada por ambos sea equivalente a la que se usó al tomar el espectro anterior. Los espectros de fondo local obtenidos se suman entre sí para luego sustraer el total del espectro medido para cada NPs. c) y d) Muestran los gráficos espectrales de la NPs y el fondo obtenidos a partir de a) y b) respectivamente. Ambos están corregidos espacialmente.

Además, producto del método empleado (rendija $1500 \mu\text{m}$), los espectros correspondientes a NPs cuya ubicación en la imagen no coincidan con el centro de la rendija se encuentran desplazados en la escala espectral, Figura 4.13. Por tal motivo, tales espectros se corrigieron según la posición relativa de las NPs con respecto al centro de la rendija:

$$\Delta\lambda_i = a(x_i - x_m) \quad (4.5)$$

$$a = \frac{(\lambda_f - \lambda_0)}{511}$$

Donde $\Delta\lambda_i$ es el desplazamiento espectral respecto al centro del i -ésimo punto, a la cantidad de nanómetros por pixel (para el objetivo de 20X, $1px = 720 \text{ nm}$), x_i es la posición de la i -ésima nanopartícula, x_m es la posición del centro de la rendija, λ_0 es la menor longitud de onda (extremo izquierdo del espectro) y λ_f es la mayor longitud de onda (extremos derecho del espectro).

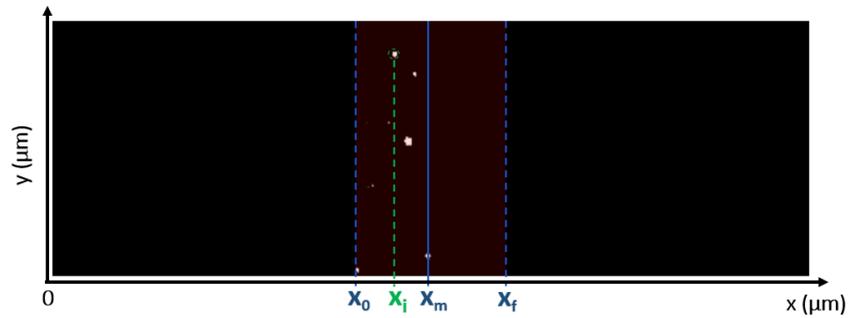


Figura 4.13: Imagen de campo oscuro de NPs de oro tomado con un ancho de rendija de $1500 \mu\text{m}$. Esta figura muestra el diagrama utilizado para corregir el desplazamiento de los espectros, donde x_0 indica la posición del extremo izquierdo de la rendija, x_i es la posición de la i -ésima nanopartícula, x_m es la posición del centro de la rendija y x_f es la posición del extremo derecho de la rendija.

A continuación se muestran algunas imágenes de campo oscuro adquiridas de las NPs de oro con sus respectivas imágenes espectrales.

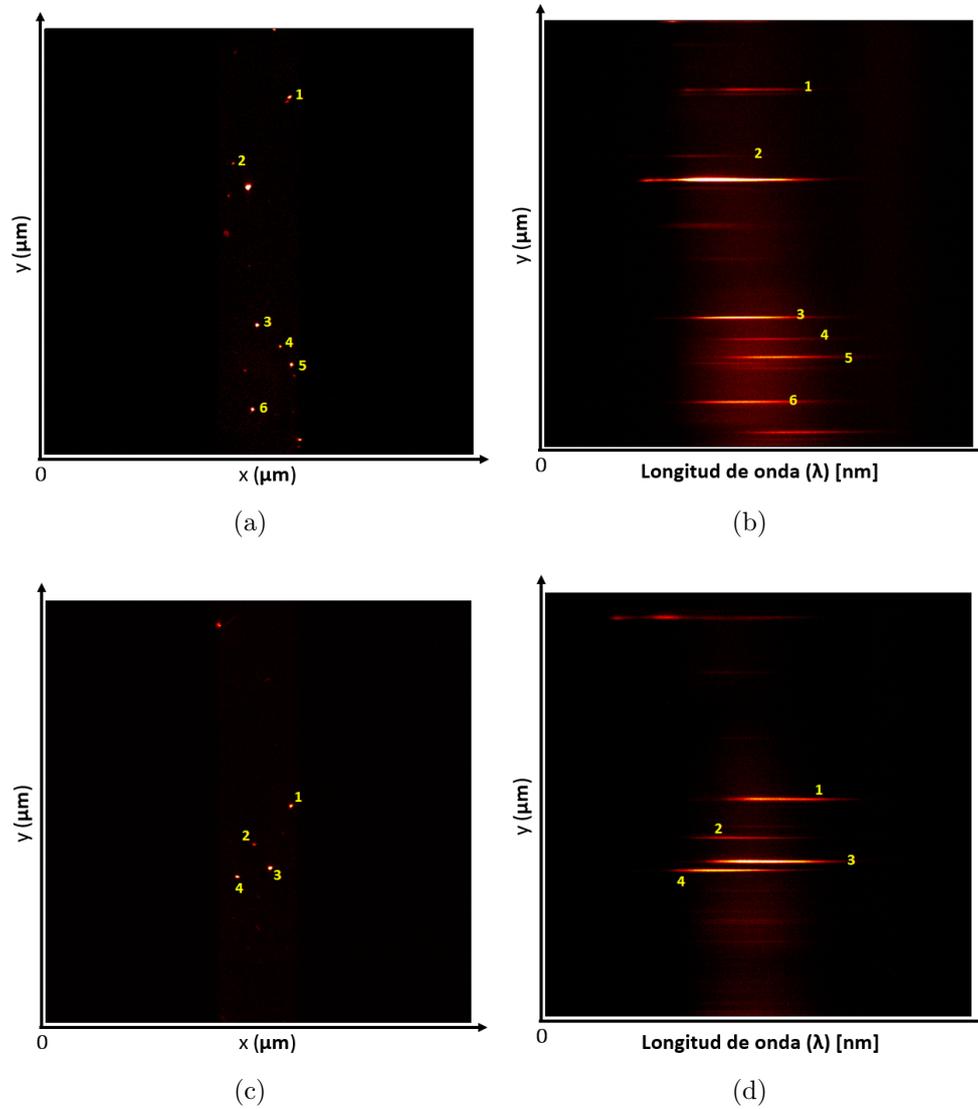
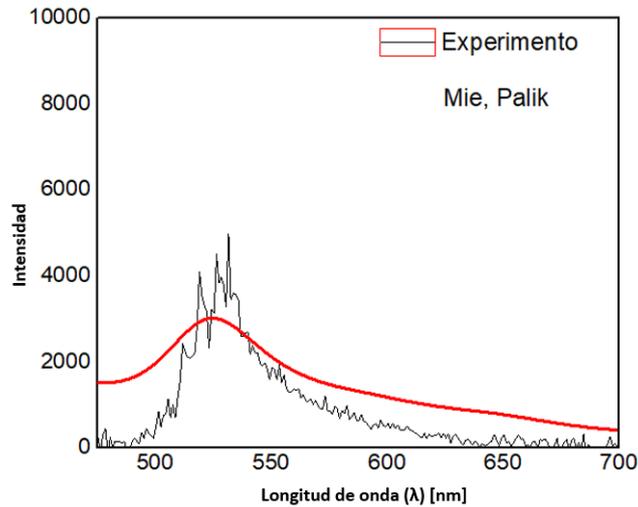
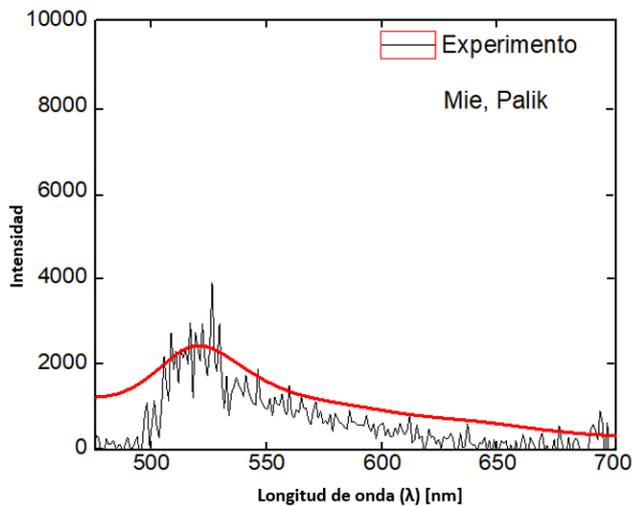


Figura 4.14: a) y c) Imágenes de campo oscuro de NPs de oro de 80 nm depositadas sobre un cobre objetos observadas con un ancho de rendija de $1500\mu\text{m}$. b) y d) Imagen espectral de las NPs de oro obtenido de a) y c) respectivamente.

Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 4.15. Como se esperaba, se observó que las energías máximas resonantes del plasmón coinciden con las calculadas por la teoría de Mie basadas en la geometría de la nanopartícula.



(a)



(b)

Figura 4.15: Espectros obtenidos de NPs de oro de 80 nm, en ambas figuras se muestra la curva obtenida a partir de la teoría de Mie para estas NPs. Se puede apreciar que la posición espectral de los máximos coincide en buen grado.

También se tomaron espectros de puntos brillantes que son significativamente distintos a aquellos de NPs individuales de oro y por lo tanto se considera que corresponden a partículas contaminantes o agregados de NPs. Dichos puntos son en su gran mayoría agregados de NPs, estos son evidentes puesto que tienen una intensidad y tamaño apreciablemente mayor al de las NPs en cuestión. Los gráficos espectrales de la Figura 4.16 exponen notoriamente que tales puntos no son NPs, puesto que difieren de los espectros de las NPs de oro.

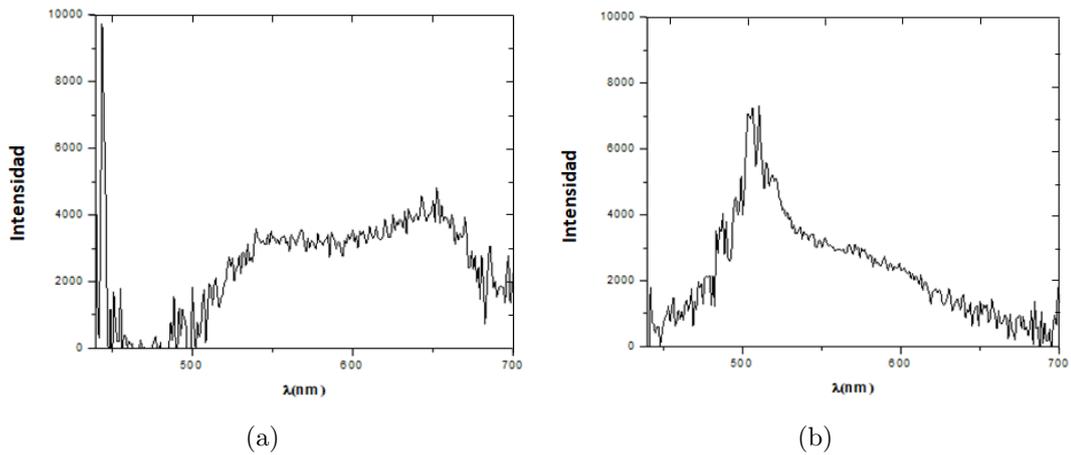


Figura 4.16: Ejemplos de espectros obtenidos de partículas contaminadas (con capacidad de dispersión similar a las NPs de oro).

Capítulo 5

Conclusión

Concluida la construcción del microscopio de campo oscuro con capacidad espectral, podemos precisar que el microscopio permite adquirir imágenes de buena calidad. Las imágenes obtenidas exponen las características de esta técnica y proporcionan información de nanopartículas que no cuentan con tinción alguna.

Como se expuso en el trabajo, también utilizamos dicho microscopio para determinar (mediante difusión Browniana) la distribución de diámetros hidrodinámicos de una muestra modelo compuesta por nanopartículas de poliestireno. La distribución obtenida fue relativamente angosta y el tamaño medio difiere al informado por el fabricante de las NPs ((220 ± 6) nm). Esto se explica considerando que la resolución espacial actual del equipo es ~ 720 nm (tamaño del pixel). Dicho tamaño es mayor al desplazamiento cuadrático medio (MSD) promedio de las NPs durante el tiempo entre dos cuadros consecutivos dificultando la determinación precisa de los coeficientes de difusión y por ende del tamaño de las NPs. Como se mencionó anteriormente, para resolver este problema es posible en principio adquirir imágenes a mayor velocidad de captura (menor tiempo entre cuadros consecutivos). Debido a restricciones de tiempo no se pudo realizar este experimento.

Se probó la capacidad espectral del microscopio mediante la caracterización espectral de NPs de oro individuales de 80 nm. Lo espectros de dispersión obtenidos de los datos experimentales fueron comparados con los esperados por la teoría de Mie, puede observarse que la posición espectral de los máximos coincide en buen grado. Algunos de los motivos por los cuales no se ajustan exactamente a la curva pueden deberse a que al modelar teóricamente el sistema no se tuvo en cuenta la influencia de la presencia del vidrio del cubre objetos (se modeló la dispersión de las NPs en aire). El ruido presente en estos espectros puede deberse a la baja transmitancia de los elementos en el camino de detección y a que el LED tiene poca intensidad de emisión en esa region. Estos espectros no están normalizados en cuanto a intensidad puesto que el espectro resultante $R(\lambda)$ y el espectro de emisión del LED $L(\lambda)$ no se obtuvieron precisamente bajo las mismas condiciones.

La teoría y los resultados presentados en este trabajo indican que el microscopio desarrollado permite describir las propiedades ópticas y estructurales de las nanopartículas metálicas individuales, proporcionando una técnica para analizar el efecto nanoestructural sobre las propiedades de dispersión de luz resonante de Rayleigh de NPs individuales. Esto es importante, debido al creciente interés en el estudio de las estructuras plasmónicas a nanoescala. La caracterización precisa de NPs individuales permite crear distribuciones de propiedades en lugar de medir el promedio, dando información más detallada de la muestra permitiendo optimizar su aplicación para diversas áreas de desarrollo nanotecnológico.

Bibliografía

- [1] Fendler E. H. and Hutter E. Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Adv. Mater*, 16, 1685, 2004.
- [2] Mock J. J., Barbic M., Smith D. R., Schultz D. A., Schultz S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J. Chem. Phys.* 116, 6755-6759, 2002.
- [3] Hu M.; et al. Dark-field microscopy studies of single metal nanoparticles: understanding the factors that influence the linewidth of the localized surface plasmon resonance. *J. Mater. Chem.* 18, 1949-1960, 2008.
- [4] Nehl C. L.; et al. Scattering Spectra of Single Gold Nanoshells. *Nano Lett.* 4, 2355-2359, 2004.
- [5] Knight M. W., Fan J., Capasso F., Halas N. J. Influence of excitation and collection geometry on the dark field spectra of individual plasmonic nanostructures. *Opt. Express*, 18, 2579-2587, 2010.
- [6] Sönnichsen C., Geier S., Hecker N. E., Von Plessen G., Feldmann J.; et al. Spectroscopy of single metallic nanoparticles using total internal reflection microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 77, 2949, 2000.
- [7] Schultz S., Smith D. R., Mock J. J. and Schultz D. A. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 996, 2000.

- [8] Truong P. L., Ma X. and Sim S. J. Resonant Rayleigh light scattering of single Au nanoparticles with different sizes and shapes. *Nanoscale*, 6, 2307-2315, 2014.
- [9] Bagnell Jr., Robert C. "Light Microscopy - Pathology 464" Ph. D. Microscopic Services Laboratory, University of North Carolina, Chapel Hill. 2012.
- [10] Wegerhoff, R., Weidich, O., Kassens, M. Basis of light microscopy image. Darmstadt: GIT VERLAG GmbH & Co. KG. 2005.
- [11] Novotny L. and Hecht B. Principles of Nano-Optics, Second Edition. Cambridge University Press, 2012.
- [12] Maier S. A. Plasmonics: Fundamentals and Applications. Springer, 2007.
- [13] Johnson P. B. and Christy R. W. *Phys. Rev. B*, 6, 4370-4379, 1972.
- [14] Mie G. *Ann. Phys.* 25, 377, 1908.
- [15] Bohren C. F. and Huffman D. R. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. Wiley, New York, 1983.
- [16] Rayleigh J.W.S. The Collected Optics Papers of Lord Rayleigh, Optical Society of America, Washington, 1994.
- [17] Band Y. B. and Yshai A. Approximation Methods. *Quantum mechanics with applications to nanotechnology and information science*. Academic Press, 303-366, 2013.
- [18] Nieto-Vesperinas, M. Fundamentos de la dispersión de Mie. *Dielectric Metamaterials* (pp. 39-72). Woodhead Publishing, 2020.
- [19] Einstein A. *Ann. Phys. (Leipzig)* 17, 549, 1905.

- [20] Smoluchowski M. *Ann. Phys. (Leipzig)* 756, 1906.
- [21] Qian H., Sheetz M.P., Elson E.L. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophysical Journal*, 60 (4), 910-921, 1991.
- [22] Saxton M. Lateral diffusion in an archipelago. Dependence on tracer size. *Biophysical Journal*, 64(4), 1053-1062, 1993a.
- [23] Kusumi A., Sako Y. and Yamamoto M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophysical Journal*, 65(5):2021-2040, 1993.
- [24] Sbalzarini I. F. and Koumoutsakos P. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *Journal of Structural Biology*. 151, 182-195, 187. 2005.
- [25] Ferrari R., Manfroi A.J., Young W.R. Strongly and weakly self-similar diffusion. *Physica D*. 154, 111-137. 2001.
- [26] Byers C. P., Hoener B. S., Chang W., Yorulmaz M., Link S. and Landes C. F. Single-Particle Spectroscopy Reveals Heterogeneity in Electrochemical Tuning of the Localized Surface Plasmon. *J. Phys. Chem. B*, 118, 14047-14055. 2014.