Tesis defendida por

Jacob Licea Rodríguez

y aprobada por el siguiente comité

Dr. Raúl Rangel Rojo
Codirector del Comité

Dr. Israel Rocha Mendoza
Codirector del Comité

Dr. Pablo Loza Álvarez
Miembro del Comité

Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez
Miembro del Comité

Dr. Víctor Ruiz Cortés
Miembro del Comité

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Coordinador
Programa de Posgrado en Óptica

Dr. Jesús Favela Vara
Director
Dirección de Estudios de Posgrado

Mayo de 2014

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

Programa de Posgrado en Ciencias
en Óptica

Implementación de técnicas de microscopía no-lineal para el estudio de materiales biológicos y nanoestructurados

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Presenta:
Jacob Licea Rodríguez

Ensenada, Baja California, México
2014

Resumen de la tesis de Jacob Licea Rodríguez, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Óptica

Implementación de técnicas de microscopía no-lineal para el estudio de materiales biológicos y nanoestructurados

Resumen aprobado por:

Dr. Raúl Rangel Rojo	Dr. Israel Rocha Mendoza
Codirector de Tesis	Codirector de Tesis

Se presenta un trabajo experimental de microscopía óptica no-lineal relacionado con las áreas de la biofotónica y procesamiento de materiales nanoestructurados. El contenido de este trabajo de tesis doctoral se divide en dos fases. En la primera fase se presenta una técnica innovadora de microscopía no-lineal de fluorescencia por excitación de dos fotones basada en una "excitación plana", la cual se crea mediante una hoja de luz láser digitalmente escaneada, denotada como DSLM (Digitally Scanned Light Sheet Microscopy, por sus siglas en inglés). El sistema óptico está diseñado para trabajar en cuatro modalidades: a) régimen lineal con haces Gaussianos (DSLM-Gauss); b) régimen no-lineal con haces Gaussianos (2p-DSLM-Gauss); c) régimen lineal con haces Bessel (DSLM-Bessel) y d) el régimen no-lineal con haces Bessel (2p-DSLM-Bessel). Se realiza una caracterización completa del sistema DSLM y se utilizan muestras vivas del nemátodo *C. elegans* para mostrar las ventajas de cada una de las modalidades disponibles. Por otro lado, en la segunda fase se muestra una aplicación de la microscopía no-lineal de generación de segundo armónico (GSA) para procesar y diagnosticar materiales compuestos que contienen nanopartículas metálicas. De manera particular, se estudia la destrucción selectiva de nanopartículas elongadas de plata embebidas en sílice, sobre las cuales se realiza una "escritura láser" en forma de guía de onda. La contribución principal de esta segunda fase es utilizar el mismo sistema de GSA para generar y monitorear los patrones escritos, y consecuentemente, para realizar el estudio del proceso de daño de las nanopartículas en función de la energía del láser, polarización y velocidad de escaneo.

Palabras Clave: **Microscopía óptica no-lineal, materiales nanoestructurados, procesos multifotónicos**

Abstract of the thesis presented by Jacob Licea Rodríguez, in partial fulfillment of the requirements of the degree of Doctor in Sciences in Optics

Nonlinear microscopy techniques implementation for the study of biological and nanostructured materials

Abstract approved by:

Dr. Raúl Rangel Rojo	Dr. Israel Rocha Mendoza
Codirector de Tesis	Codirector de Tesis

An experimental work related with the fields of biophotonics and nanostructured materials processing is presented. This thesis is structured in two phases. In the first phase it is shown an innovative nonlinear optical microscopy technique of two-photon excited fluorescence based in a "planar excitation", which is generated through a digitally scanned laser light sheet and named as DLSM (Digitally Scanned Light Sheet Microscopy). The optical system has been designed to work in four modalities: a) a linear regime using Gaussian beams (DSLM-Gauss); b) a nonlinear regime using Gaussian beams (2p-DSLM-Gauss); c) a linear regime using Bessel beams (DSLM-Bessel); and d) a nonlinear regime using Bessel beams (2p-DSLM-Bessel). A complete characterization of the DSLM system is performed and samples of live *C. elegans* nematode are employed to show the advantages of each modality. Otherwise, in the second phase of this work, an application of the second harmonic generation microscopy for processing composite materials containing metallic nanoparticles is presented. In particular, the selective destruction of elongated silver nanoparticles embbeded in a silica matrix is studied, where waveguide-like patterns through "laser writing" are performed. The main contribution of this second phase, is using the SHG microscope system to simultaneously induce and monitor the structural modification of silver nanoparticles, and performing a complete study of the nanoparticles damage process as a function of the laser energy, polarization and scan velocity.

Keywords: **Nonlinear optical microscopy, nanostructured materials, multiphoton processes**

A mis padres y hermanos. Quienes en todo momento me han brindado todo su apoyo de manera incondicional.

Agradecimientos

- A mis padres y hermanos que nunca han dudado en darme todo su apoyo y comprensión incondicional, pero sobre todo por su gran amor y cariño.
- A mis co-directores de tesis: Dr. Raúl Rangel Rojo y Dr. Israel Rocha Mendoza, por haberme permitido desarrollar este proyecto de tesis Doctoral baja su dirección. Por su amistad, confianza y paciencia.
- A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Pablo Loza Álvarez, Dr. Eugenio Méndez Méndez y Dr. Víctor Ruiz Cortés. De manera especial mi agradecimiento al Dr. Pablo Loza Álvarez por haberme permitido realizar mi estancia académica bajo su dirección en el ICFO.
- Al Dr. Marcos Plata por su apoyo en el laboratorio.
- A todos mis compañeros y amigos de Óptica.
- Al CONACyT por su apoyo económico para llevar a cabo la realización de este proyecto de tesis.

Contenido

Página

Resumen en español **i**

Resumen en inglés **ii**

Dedicatoria **iii**

Agradecimientos **iv**

Lista de figuras **vii**

Lista de Tablas **xii**

1. Introducción **1**
- 1.1 Antecedentes . . . 1
- 1.2 Objetivos . . . 9
- 1.3 Estructura de la tesis . . . 10

2. Fundamentos teóricos **12**
- 2.1 Descripción clásica de la óptica lineal y no-lineal: Modelo de Lorentz . . . 12
  - 2.1.1 Óptica lineal . . . 13
  - 2.1.2 Óptica no-lineal . . . 15
- 2.2 Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF) . . . 17
- 2.3 Generación de segundo armónico (GSA) . . . 20
  - 2.3.1 GSA en microscopía no-lineal . . . 22
  - 2.3.2 GSA en nanopartículas de plata . . . 23
- 2.4 Conceptos básicos de plasmónica . . . 27
  - 2.4.1 Plasmón polaritón de superficie . . . 28
  - 2.4.2 Plasmones localizados en partículas esféricas y cilíndricas . . . 30
- 2.5 Efectos térmicos inducidos por láseres pulsados . . . 32
- 2.6 Descripción del sistema de microscopía óptica de barrido . . . 36

3. Microscopía no-lineal de TPEF basada en una hoja de luz láser digital escaneada **39**
- 3.1 Antecedentes . . . 39
- 3.2 Arreglo experimental . . . 43
- 3.3 Grabado y procesamiento de imágenes . . . 47
- 3.4 Preparación de las muestras . . . 48
  - 3.4.1 Cumarina y microesferas fluorescentes . . . 48
  - 3.4.2 Muestras biológicas . . . 49
- 3.5 Resultados . . . 50

3.5.1 Caracterización del sistema 50
3.5.2 Imágenes de *C. elegans* 57
3.6 Discusión 62

4. Monitoreo y escritura láser en compósitos de nanopartículas de plata utilizando microscopía de generación de segundo armónico 65
4.1 Antecedentes 65
4.2 Fabricación de las muestras 67
4.3 Arreglo experimental 69
4.3.1 Escritura de patrones utilizando el láser 72
4.4 Resultados y discusión 73
4.4.1 Monitoreo y escritura de guías 73
4.4.2 Estudio del daño en las NPs-Ag 75
4.4.3 Escritura de guías 81

5. Conclusiones 84
5.1 Respecto a la microscopía no-lineal de TPEF basada en una hoja de luz láser digitalmente escaneada 85
5.2 Respecto al monitoreo y escritura láser en compositos de nanopartículas de plata utilizando microscopía de generación de segundo armónico . . . 86
5.3 Propuestas para trabajo a futuro 89

Referencias bibliográficas 91

Lista de figuras

Figura — Página

1 Localización de la excitación en una muestra fluorescente utilizando un láser de emisión continua en 488 nm a) y un láser pulsado en 960 nm b). En el caso de la iluminación a 960 nm la excitación solamente se da en el plano focal dentro de la muestra (imagen tomada de Zipfel *et al.*, 2003). 5

2 Diagrama de la microscopía de fluorescencia cuya excitación está basada en una hoja de luz. 6

3 a) Modelo de Lorentz. Medio sin campo eléctrico incidente (b) y bajo la influencia de un campo eléctrico $\vec{E}$ incidente (c). 13

4 Diagrama de energía para los procesos de absorció de a) un fotón y b) dos fotones. c) Espectros de absorción y de emisión de la proteína fluorescente cyan (CFP). 18

5 Diagrama de Jablonski para la descripción cuántica de la generación de segundo armónico. Las líneas segmentadas indican estados electrónicos virtuales. 21

6 a) Configuración del experimento de GSA en reflexión hecho por (Rocha-Mendoza *et al.*, 2011). b) Orientación de la muestra de NPs-Ag elongadas para $\Phi = 180$ con respecto al sistema coordenado (x,y,z) del laboratorio. . . 26

7 a) Dependencia polar simulada y experimental de la intensidad de GSA de las NPs-Ag elongadas para $\Phi = 180°$. b) Dependencia polar experimental de la intensidad de GSA para NPs-Ag esféricas. En las gráficas las intensidades experimentales de GSA total, para la polarización p y s se denotan por los cuadrados negros, círculos rojos y triángulos azules, respectivamente. Mientras que las intensidades de GSA simuladas se representan por líneas sólidas con las misma convención de color. 27

8 Líneas de campo debido a un plasmón en una interfaz metal-dieléctrico. La longitud de propagación a la cual la intensidad del PPS cae a $1/e$ en la dirección $\hat{x}$ se representa por ℓ_{sp}; y las constantes de decaimiento en la dirección perpendicular a la superficie (dirección $\hat{z}$) para los medios 1 y 2 están dadas por $\ell_{\varepsilon 1}$ y $\ell_{\varepsilon 2}$, respectivamente. 28

9 a) Espectros de absorción de NPs-Ag esféricas con diámetros en el rango de $10 - 100$ nm. b) Espectros de absorción de NPs-Ag elongadas para polarización paralela al eje mayor de las NPs-Ag, "p", (línea continua) y polarización perpendicular al eje mayor de las NPs-Ag, "s", (línea segmentada), imagen tomada de (Rangel-Rojo *et al.*, 2009). 31

Figura Página

10 Diagrama de la generación de un haz Bessel a partir de un haz Gaussiano utilizando un axicón. El haz Bessel se puede formar en la distancia de propagación Z_{max}. 42

11 Diagrama esquemático del arreglo experimental del sistema DLSM implementado. La base de traslación S1 permite cambiar entre el régimen lineal (el haz del láser pasa a través del cristal de SHG y las lentes L1 y L2) y el no-lineal (el haz láser pasa directamente). Los haces Gaussianos o Bessel son seleccionados moviendo la base de traslación S2 que contiene el axicón y la lente L3. El espejo galvanométrico (GM), la lente escaneadora (SL), la lente de tubo (TL) y el objetivo de excitación (EO) son usados para crear la hoja de luz en el plano de la muestra. La señal de fluorescencia generada en la muestra es colectada a 90° por el objetivo de colección (CO) y una lente de tubo (TLC) que forma la imagen en la cámara CCD. El filtro F2 es utilizado para bloquear la luz de excitación y transmitir la luz de la fluorescencia generada. El esquema del recuadro colocado en la parte superior derecha muestra la geometría de la excitación y colección que define la notación de los ejes utilizados en este trabajo. 44

12 Esquema de la obtención de imágenes de la faringe de un *C. elegans* a diferentes planos. Posteriormente las imágenes pueden ser procesadas para realizar una visualización tridimensional de la muestra en estudio. 48

13 Esquema de la estructura anatómica de un *C. elegans* adulto. 50

14 Imágenes de fluorescencia normalizadas y perfiles de intensidad a lo largo de la dirección x y y para las diferentes modalidades: a-c) DSLM con haces Gaussianos; d-f) 2p-DSLM con haces Gaussianos; g-i) DSLM con haces Bessel y j-l) 2p-DSLM con haces Bessel. Los anchos FWHM son indicados con las flechas para cada modalidad, asimismo se muestran los valores correspondientes Δx y Δy. Estos valores también son resumidos en la tabla 1. Los perfiles fueron tomados a lo largo de las direcciones x y y con el punto de máxima intensidad localizado en el origen de las coordenadas. La barra de escala corresponde a 50 μm. 52

15 Imágenes de las hojas de luz generadas en una solución de cumarina a diferentes amplitudes. Para la modalidad DSLM-Gauss los voltajes aplicados al sistema GM fueron de a) 0 mV, b) 300 mV y c) 600 mV. Las imágenes en las figuras 3 d), 3 e) y 3 f) corresponden a la modalidad 2p-DSLM-Gauss para los voltajes aplicados al GM de 0 mV, 300 mV y 600 mV, respectivamente. La escala de barra representa 50 μm. 53

Figura Página

16 Ejemplo de las PSFs obtenidas para el sistema usando microesferas fluorescentes inmersas en agar. Se muestran los perfiles de intensidad experimentales (puntos negros) y los ajustes Gussianos (líneas rojas) para las dimensiones transversa (δr) y axial (δz) para las diferentes modalidades: a, b) DSLM con haces Gaussianos; c, d) 2p-DSLM con haces Gaussianos; e, f) DSLM con haces Bessel y g,h) 2p-DSLM con haces Bessel. Los anchos FWHM calculados considerando los ajustes Gaussianos y las imágenes de distribución de intensidad correspondientes son mostrados sobre cada gráfica. 55

17 Imágenes de fluorescencia la faringe de un C. elegans. Las figuras a)-c) son imágenes de proyección de máxima intensidad tomadas con a) el sistema SPIM convencional, b) DSLM-Gauss y c) 2p-DSLM-Gauss. Las figuras d)-f) muestran imágenes de secciones ópticas individuales obtenidas con SPIM convencional, DSLM y 2p-DSLM-Gauss, respectivamente. Para hacer la reconstrucción tridimensional completa de la faringe fue necesario tomar 54 imágenes, cada una con un paso de 2 μm en la dirección z. La barra de escala representa 20 μm. 58

18 Ejemplo de la mejora del contraste obtenido con la modalidad 2p-DSLM-Gauss. Imágenes de fluorescencia tomadas de una sola sección óptica de la zona de la faringe enmarcada en la figura 4 utilizando a) DSLM-Gauss y b) 2p-DSLM-Gauss. c) Gráfica de los perfiles de intensidad a lo largo de las líneas marcadas para ambas modalidades. Los perfiles de intensidad fueron normalizados al máximo de cada distribución. 59

19 Imágenes de fluorescencia de un conjunto de C. elegans alineados a lo largo de la dirección x. La figura a) es una imagen de campo claro tomada con iluminación oblícua y usada como referencia. En las figuras b)-e) se muestran las imágenes de proyección de máxima intensidad adquiridas con las cuatro modalidades: b) DSLM-Gauss, c) 2p-DSLM-Gauss, d) DSLM-Bessel y e) 2p-DSLM-Bessel. Debajo de cada imagen se muestra la posición y la extensión de las líneas de luz utilizadas para la excitación. Para cada modalidad se tomó un stack de 50 imágenes con un paso de 2 μm. La barra de escala representa 50 μm. 60

20 Perfiles normalizados a lo largo de la línea seleccionada tomados para todas las modalidades. Imágenes de fluorescencia tomadas de la zona de la faringe enmarcada en la figura 6 para a) DSLM-Gauss, b) 2p-DSLM-Gauss, c) DSLM-Bessel y d) 2p-DSLM-Bessel. e) Perfiles de intensidad a lo largo de la línea seleccionada, la intensidad de cada perfil fue normalizada a su valor máximo respectivo. 62

Figura Página

21 Esquema del proceso de fabricación de las NPs-Ag. a) primera fase: la implantación iónica seguida de un tratamiento térmico resulta en NPs-Ag esféricas. b) segunda fase: una segunda implantación iónica del material huésped a 45° resulta en NPs-Ag elongadas. En la figura *xyz* representan el sistema de coordenadas en el laboratorio y $\hat{n}$ es la normal a la superficie de la muestra. c) Imagen TEM de la capa delgada que contiene NPs-Ag elongadas alineadas en una dirección preferente. Las flechas indican las NPs-Ag esféricas que quedan después del segundo proceso de implantación iónica. El recuadro muestra la imagen de la morfología de una nanopartícula elongada. 68

22 Esquema del sistema de microscopía no-lineal implementado. En el recuadro se muestra el esquema del haz utilizado para el proceso de excitación y escritura sobre la muestra de NPs-Ag. En la figura xyz representan el sistema de coordenadas en el laboratorio, $\hat{p}$ y $\hat{s}$ representan las polarizaciones paralela y perpendicular del haz incidente, respectivamente, $\hat{k}_\omega$ indica la dirección de propagación del haz de excitación. La señal de GSA es colectada en transmisión por un PMT. 70

23 a) Espectro de absorción plasmónica de las NPs-Ag elongadas para las polarizaciones $\hat{p}$ y $\hat{s}$. También se muestra el espectro del láser utilizado. b) Imagen de GSA después del proceso de escritura, la señal es máxima para la polarización $\hat{p}$. Imágenes de transmisión utilizando la lámpara de halógeno del microscopio para la polarización en c) $\hat{s}$ y d) $\hat{p}$. La proyección del eje mayor de las NPs-Ag está en la dirección del eje x. 73

24 Señal del PMT como función de la fluencia del láser a) y ángulo de polarización b). Las flechas en a) indican las fluencias usadas en la figura b) tal y como están etiquetadas. Los cuadrados, círculos y triángulos representan uno, dos y cinco barridos del haz láser, respectivamente. 76

25 Señal del PMT como función del tiempo de vuelo por micrómetro a diferentes fluencias (mismas utilizadas en la figura 24). Los cuadrados, círculos y triángulos representan uno, dos y cinco barridos, respectivamente. 78

26 Dependencia polar de la señal de GSA tomada después del proceso de escritura a diferentes fluencias, tiempo de vuelo y número de barridos. La imagen de GSA en el recuadro tomada a 2 mJ/cm^2 muestra las diferentes zonas irradiadas: 1) No se induce daño láser; 2) escritura láser a una fluencia de 4.7 mJ/cm^2, tiempo de vuelo de 1 $ms/\mu m$ y se realizó un barrido; 3) escritura láser a una fluencia de 4.7 mJ/cm^2, tiempo de vuelo de 1 $ms/\mu m$ y se realizaron cinco barridos; 4) Daño causado usando la máxima fluencia (14.6 mJ/cm^2) disponible en nuestro sistema manteniendo el haz láser estático. 81

27 Imágenes de GSA tomadas antes a) y después b) del proceso de escritura. c) Acercamiento de la zona indicada por el recuadro en la figura b) donde se aprecian los patrones escritos en forma de guía de onda. d) Perfil de la señal de GSA de la línea trazada en la figura c). 82

Lista de Tablas

Tabla Página

1 Sumario de los anchos medidos al FWHM para las líneas de luz (Figura 14) y para las PSFs del sistema (Figura 16). El valor promedio y el error estadístico en las PSFs fueron obtenidos sobre 30 mediciones. 56

2 Sumario de los parámetros experimentales empleados en la Figura 17. El objetivo de microscopio marcado con † fue de inmersión en agua, el resto fueron para operar en aire. 57

3 Sumario de los parámetros experimentales empleados en la figura 19. 61

Capítulo 1

Introducción

1.1 Antecedentes

La investigación en torno a la dinámica y propiedades de estructuras celulares y subcelulares, es tema de gran interés en biología y medicina. Esta investigación requiere de sistemas de formación de imágenes con un alto contraste y una alta resolución. Para llevar a cabo este tipo de estudios ha sido indispensable el uso de técnicas microscópicas tales como la microscopía electrónica y la microscopía óptica de fluorescencia (Lakowicz, 2007). Sin embargo, estas técnicas son inherentemente destructivas por la energía de radiación de la fuente de excitación y además requieren de una preparación previa de la muestra para poder ser observada (Hilderbrand, 2010). De ahí que, en las últimas dos décadas, el uso de fuentes láser de pulsos ultracortos y de sistemas de barrido láser para inducir procesos ópticos no-lineales a escalas micrométricas, ha sido una combinación exitosa para implementar técnicas de microscopía no destructivas para estudiar sistemas *in vivo* (Köning, 2000). A este tipo de microscopía se le conoce como microscopía no-lineal y es el tema central de esta tesis. En particular se implementarán y se estudiarán dos técnicas de microscopía no-lineal: la fluorescencia inducida por la absorción de dos fotones y la generación de segundo armónico.

Para introducir el tema es necesario saber qué es la microscopía óptica de fluorescencia. Tal y como su nombre lo indica, ésta está basada en el fenómeno de la fluorescencia, que es una propiedad que tienen ciertos elementos químicos (o sustancias) denominados fluoróforos o fluorocromos de emitir luz visible posterior a la incidencia de una radiación. En este proceso un fotón, normalmente en el ultravioleta, es absorbido por el fluoróforo, excitando un electrón

de su estado base a un estado superior, decayendo después a estados excitados de menor energía dándose una disipación de energía (generalmente en forma de calor), y finalmente retorna a su estado base, emitiendo un fotón de fluorescencia con una longitud de onda mayor a la de excitación (ver figura 4a, Capítulo 2). La transición desde el estado excitado superior al estado base se da en un tiempo de alrededor de 10 nanosegundos (10×10^{-9} segundos) (Lakowicz, 2007). En la microscopía óptica de fluorescencia, la preparación de la muestra consiste en un proceso de fijado, o bien en un teñido de la misma con marcadores fluorescentes (fluoróforos) (Hilderbrand, 2010). Por lo tanto, una de las desventajas que aún prevalecen en este tipo de microscopía es que dicho "marcaje" puede influir en la validez e interpretación de los resultados obtenidos.

La microscopía óptica de fluorescencia convencional requiere de fuentes de luz en el rango del ultravioleta cercano. De aquí que, generalmente se utilicen lámparas de halógeno-cuarzo y/o de arco de mercurio, para estos fines (Lakowicz, 2007). Sin embargo, con estas fuentes se necesita depositar una cantidad apreciable de energía para tener una buena generación de señal, lo cual puede provocar daños irreversibles en la muestra (Tyrell y Keyse, 1990). Por otro lado, esta técnica tiene otra desventaja, que es la de causar excitación de fluoróforos en todo el volumen irradiado de la muestra, resultando en una baja resolución axial. Estas limitaciones se han superado por otras técnicas como la microscopía confocal de barrido láser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM, por sus siglas en inglés).

En la CLSM se utiliza uno o varios láseres continuos a diferentes longitudes de onda como fuentes de excitación. Mediante un objetivo de microscopio se enfoca una gran intensidad de la luz en una región muy pequeña de la muestra. Luego, mediante un par de espejos galvanométricos, el haz láser es barrido sobre la muestra y la señal de fluorescencia es colectada para formar la imagen. Para obtener resolución axial, se utiliza un filtro espacial en la de-

tección localizada en el plano conjugado del plano focal. De esta manera se colecta solamente la luz (señal de fluorescencia) proveniente del plano focal, eliminando así la señal proveniente de otros planos (Sheppard, 1989). Esto resulta en imágenes con un mayor contraste y la posibilidad de obtener "secciones ópticas" de la muestra, lo que permite obtener imágenes tridimensionales. Sin embargo, en el sistema CLSM la razón señal/ruido sigue siendo aún baja.

Por otro lado, en las últimas dos décadas se han desarrollado técnicas basadas en procesos de absorción no-lineal (multifotónicos). La microscopía multifotónica (multiphoton microscopy, MPM, por sus siglas en inglés), es una forma de microscopía de barrido láser basada en uno o varios procesos de óptica no-lineal mediante los cuales dos o más fotones interactúan en la muestra en cuestión, causando la emisión de un fotón a una longitud de onda más corta. Los efectos ópticos no-lineales dependen de la intensidad incidente, por lo tanto, para una intensidad suficientemente alta en el plano de enfoque de la muestra, se tendrá una buena resolución axial (Zipfel *et al.*, 2003). Para esto, comúnmente se utilizan láseres pulsados de femto-segundos (1 fs = 10^{-15} segundos). La principal característica de los pulsos de estos láseres, es que aún cuando la potencia pico del pulso sea extremadamente alta, la energía por pulso es moderadamente baja, esto debido a que la energía está concentrada en un intervalo de tiempo muy corto. Por ejemplo, un oscilador típico de pulsos láser no amplificado produce pulsos de 100 fs con una taza de repetición de 100 MHz y una potencia promedio de 300 mW, lo cual equivale a una energía de 3 nJ/pulso y a una potencia pico de 30 KW que enfocada en 1 μm^2 alcanza una irradiancia pico de 300 GW/cm^2. Este tipo de excitación, en contraste con la utilizada en la microscopía confocal, ofrece varias ventajas. Por ejemplo, la luz infrarroja sufre menos esparcimiento en especímenes biológicos, existiendo menor distorsión en el enfoque, lo que resulta en una mayor profundidad de penetración en

el material biológico. Además, se reducen los efectos de foto-desgaste y daño en la muestra (Patterson y Piston, 2000; Hop y Nether, 2001; Drummond *et al.*, 2002), siendo convenientemente utilizada en estudios de micro-organismos dentro de tejido intacto y animales vivos (Köning, 2000). Precisamente la ventaja principal de la microscopía multifotónica es que es no destructiva y posee la capacidad de extraer información de orientación y composición molecular (Campagnola *et al.*, 2002; Reiser *et al.*, 2007; Psilodimitrakopoulos *et al.*, 2009).

La fluorescencia por excitación de dos fotones (two photon excited fluorescence, TPEF, por sus siglas en inglés), ha sido tradicionalmente el mecanismo más simple para realizar microscopía no-lineal. La TPEF es un proceso óptico no-lineal de tercer orden, en el cual se requiere la absorción subsecuente (cuasi-simultánea) de dos fotones cada uno con una energía E_{exc} menor a la brecha de energía E_g entre el estado electrónico base y el estado electrónico excitado del fluoróforo en estudio pero mayor a la mitad de E_g, es decir $E_g > E_{exc} > E_g/2$. El electrón después decae a estados excitados de menor energía, dándose una disipación de energía, para finalmente decaer a su estado electrónico base, causando la emisión de un fotón (de fluorescencia) a una frecuencia óptica mayor al doble de la frecuencia de excitación (ver figura 4b, Capítulo 2). En el proceso de TPEF, a diferencia de la CLSM, la excitación (y por consecuencia la absorción) es muy localizada y sólo se da en el plano de enfoque en la muestra tal y como se ve en la figura 1 (So *et al.*, 2000; Zipfel *et al.*, 2003). Es importante mencionar que la luz de fluorescencia emitida es incoherente, no direccional y no depende del estado de polarización del haz de excitación, siendo así insensible a orientación y composición molecular. Esta técnica, al igual que la CLSM, requiere de un sistema de barrido y la señal de fluorescencia obtenida durante el barrido es colectada y enviada hacia un sistema de detección para formar la imagen. El barrido láser puede ser de dos tipos: que el haz se desplace sobre la muestra ("beam scanning") o que sea la muestra la que se desplace mientras el haz permanece

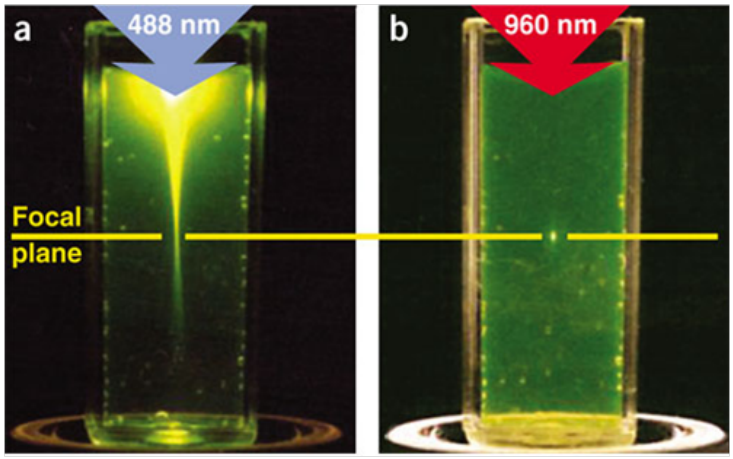

Figura 1. Localización de la excitación en una muestra fluorescente utilizando un láser de emisión continua en 488 nm a) y un láser pulsado en 960 nm b). En el caso de la iluminación a 960 nm la excitación solamente se da en el plano focal dentro de la muestra (imagen tomada de Zipfel *et al.*, 2003).

inmóvil ("stage scanning"). El primer tipo es el más comúnmente empleado, ya que tiene la ventaja de una mayor velocidad de barrido y por tanto de formación de la imagen. Además, el espécimen no necesita ser movido durante el muestreo por lo que no necesita ser fijado, lo que lo hace especialmente interesante para el estudio de células vivas.

A mediados de la década pasada, surgió una variante de la microscopía TPEF, en donde la excitación está basada en una hoja de luz (Huisken *et al.*, 2004). La hoja de luz de excitación es proyectada sobre el plano de interés en la muestra, la luz de fluorescencia emergente de dicho plano es colectada con un objetivo de microscopio orientado a 90° respecto a la excitación tal y como se muestra en la figura 2. Con esta técnica, la adquisición de imágenes es más rápida, ya que en una sola proyección se excita un plano completo de la muestra. Además, permite el estudio de muestras biológicas relativamente grandes. Existen diversas variantes de esta técnica, las cuales se basan en el tipo de excitación empleada y en la forma de generación de la hoja de luz. La versión tradicional es conocida como microscopía de iluminación de plano selectivo ("selective plane illumination microscopy", SPIM, por sus

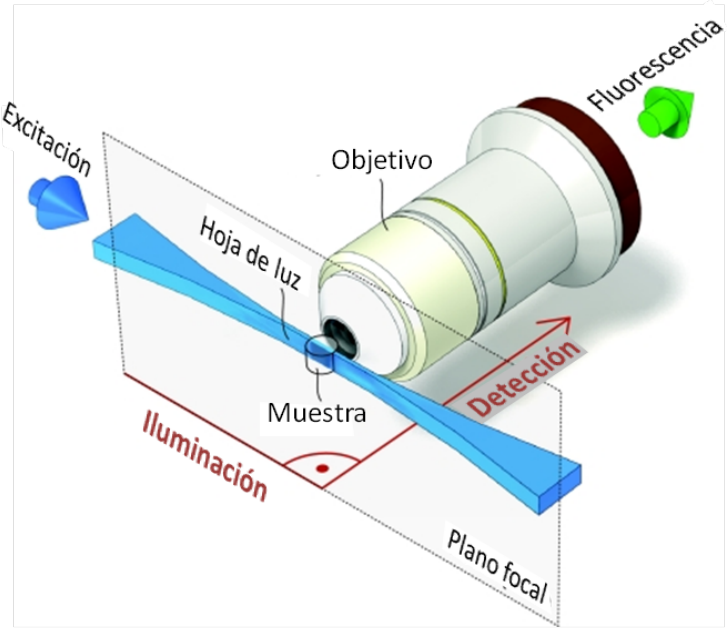

Figura 2. Diagrama de la microscopía de fluorescencia cuya excitación está basada en una hoja de luz.

siglas en inglés) (Huisken *et al.*, 2004; Greger *et al.*, 2007). En este caso la hoja de luz es generada por una lente cílindrica y al igual que en la microscopía confocal, la excitación es mediante absorción (lineal) de un fotón. Es decir, se utiliza uno o varios láseres de emisión continua con longitudes de onda cercanas al ultravioleta. Sin embargo, el uso de estas fuentes, en tejido por ejemplo, tiene la desventaja de que la luz de excitación sufre un mayor esparcimiento, limitando así la adquisición de imágenes a una profundidad de penetración reducida. Además, la hoja de luz generada por la lente cílindrica no es muy homogénea. Por esta razón, se implementó otra variante de SPIM en la cual la excitación es mediante dos fotones (2p-SPIM), ésta última ha sido utilizada para visualizar la faringe del nemátodo *Caernohabditis elegans* (*C. elegans*) que contiene la proteína fluorescente cameleon (Palero *et al.*, 2010). La mejora de esta técnica prevalece en el uso de la excitación en el infrarrojo mediante un láser (Ti:zafiro) pulsado de femtosegundos, lográndose así un menor

esparcimiento en la muestra y por lo tanto una mayor profundidad de penetración en la misma.

Otra variante de la técnica SPIM es la microscopía de una hoja de luz (láser) digital escaneada (DSLM, por sus siglas en inglés). En esta técnica la hoja de luz es generada al escanear un haz enfocado en la dirección perpendicular a la propagación del mismo (Keller *et al.*, 2008). Las ventajas de DSLM, con respecto a SPIM y 2p-SPIM, son dos: a) la potencia de la luz de excitación se concentra solamente en la línea de luz que forma la hoja proporcionando una mejor eficiencia de iluminación y tiempos de exposición más bajos, y b) la hoja de luz generada es más homogénea en intensidad y su ancho puede ser fácilmente controlado variando la amplitud del barrido. Recientemente, Truong (Truong *et al.*, 2011) reportó el uso de DSLM utilizando excitación de dos fotones (2p-DSLM) en embriones de pez cebra y de mosca de fruta. En dicho trabajo se muestran las ventajas de usar 2p-DSLM sobre 1p-DSLM y microscopía de TPEF de barrido láser. Estas ventajas prevalecen en el uso de excitación en el infrarrojo y en la homogeneidad de la hoja de luz generada, lo cual resulta finalmente en la adquisición de imágenes de organismos vivos a una mayor profundidad, de una manera más rápida y con menos efectos de fotodaño. Por otro lado, se ha demostrado que el uso de haces Bessel permite adquirir imágenes en un campo mayor de visión y con una mayor profundidad en comparación con los haces Gaussianos (Fahrbach *et al.*, 2010). Sin embargo, la combinación de la técnica DSLM utilizando haces Bessel no ha sido del todo explorada, hasta estos días. En este sentido, la primera parte del trabajo que se presenta en esta tesis se basa en mostrar como 2p-DSLM combinado con haces Bessel mejoran el seccionado óptico, la resolución espacial y la uniformidad de la intensidad en la hoja de luz. Además, se mostrará la obtención de un mayor campo de visión lo cual es muy benéfico para el estudio de muestras más grandes, tales como las muestras *in vivo* de *C. elegans*.

Por otro lado, la generación de segundo armónico ("second harmonic generation", SHG, por sus siglas en inglés), que a partir de ahora se denotará como GSA, ha sido utilizada cada vez más en años recientes para realizar microscopía no-lineal. Este mecanismo es un proceso no lineal de segundo orden, en donde la luz generada, a diferencia de TPEF, es coherente y sensible a la polarización de la luz excitante, de ahí que ofrece información de orientación molecular (Reiser *et al.*, 2007; Rocha-Mendoza *et al.*, 2007).

En el proceso de GSA, dos fotones (ω_L) son "combinados" simultáneamente para producir un tercer fotón ($2\omega_L$) cuya frecuencia es justo el doble de la frecuencia de la luz incidente. La generación armónica depende de la susceptibilidad de segundo orden $\chi^{(2)}$, la cual sólo existe para medios no centrosimétricos o en interfaces entre dos medios centrosimétricos, en donde existe un rompimiento de la simetría central, generándose así, la señal sólo en dichas interfaces. La microscopía de GSA se puede aplicar en la obtención de imágenes de especímenes biológicos con un alto contraste, sin la necesidad de etiquetar o teñir la muestra (Campagnola y Loew, 2003). Esto debido a las inhomogeneidades inherentes a estos organismos y a la naturaleza no-lineal del proceso. La microscopía por GSA también se ha utilizado para obtener imágenes de estructuras macro-moleculares no centrosimétricas, tales como las fibras de colágeno y los microtúbulos (Williams *et al.*, 2001).

El uso de los sistemas de microscopía no-lineal basados en el proceso de GSA se ha enfocado, en gran parte, a estudios en las áreas de biología y medicina. Sin embargo, su uso y/o aplicación en el área de materiales (nanoestructurados) es aún muy poco explorado. De manera particular, los materiales nanoestructurados compuestos de nanopartículas metálicas han llamado mucho la atención en los últimos años. Esto, debido a sus propiedades ópticas no lineales, las cuales pueden ser usadas en nanodispositivos fotónicos o circuitos plasmónicos (Matsui, 2005). Recientemente, en el grupo de Láseres de Pulsos Ultracortos

y Procesamiento de Materiales del Departamento de Óptica del CICESE se han estudiado, mediante experimentos de GSA (Rocha-Mendoza *et al.*, 2011) y z-scan (Rangel-Rojo *et al.*, 2009), las propiedades ópticas no-lineales de segundo y tercer orden en materiales compuestos con nanopartículas (elongadas y esféricas) de plata incrustadas en sílice. En estos experimentos se ha encontrado que las propiedades ópticas no-lineales dependen de la geometría, tamaño, distribución y polarización de la luz incidente, lo cual hace a este material atractivo para la fabricación de guías de onda no-lineales, o bien, dispositivos de conmutación óptica. La técnica comúnmente usada para la fabricación de nanopartículas es la de implantación iónica en matrices dieléctricas (Oliver *et al.*, 2006; Vilayurganapathy *et al.*, 2013). Esta técnica permite tener un buen control del tamaño de la nanopartícula, así como de la concentración y profundidad de la implantación. Sin embargo, fabricar guías de onda mediante este método es todavía un reto, ya que representa cierta complicación experimental. Una alternativa para producir patrones en forma de guías de onda es mediante la escritura directa utilizando un láser de femtosegundos en un microscopio no-lineal. En este sentido, la segunda parte del trabajo realizado en esta tesis consiste en utilizar un sistema de microscopía no-lineal para escribir y caracterizar patrones en forma de guías de onda en muestras que contienen nanopartículas elongadas de plata incrustadas en sílice. Con este sistema se pueden escribir y monitorear, de una manera fácil y versátil, diferentes patrones de estructuras fotónicas de guiado e incluso rejillas de Bragg, lo cual resultaría complicado hacer mediante la técnica de implantación iónica.

1.2 Objetivos

El objetivo general de esta tesis es implementar y aplicar técnicas de microscopía óptica basadas en diferentes efectos no-lineales para estudiar tanto sistemas biológicos como ma-

teriales nanoestructurados. Para el logro de este propósito, se plantean los siguientes dos objetivos particulares:

1. Implementar nuevas técnicas de microscopía no-lineal de fluorescencia inducida por excitación de dos fotones para su uso en aplicaciones biológicas.

2. Aplicar las técnicas de microscopía no-lineal para la escritura, monitoreo y estudio de patrones de estructuras fotónicas en materiales nanoestructurados.

1.3 Estructura de la tesis

La tesis comprende cinco capítulos y está estructurada de la siguiente manera.

En el capítulo 1 se presenta una breve introducción de las técnicas de microscopía de fluorescencia convencional y multifotónica. Asimismo, se describen las ventajas y limitaciones de cada una de ellas. También se presentan los objetivos y la estructura de la tesis.

Los conceptos básicos necesarios para la tesis se presentan en el capítulo 2, en donde se hace una descripción de los fenómenos ópticos no-lineales de la fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF) y la generación de segundo armónico (GSA) que están involucrados en la microscopía multifotónica. Además, se hace una breve descripción de los fundamentos básicos de la plasmónica y de los efectos térmicos inducidos en la materia por láseres pulsados. Al final de este capítulo, se presenta una descripción general de un sistema de microscopía no-lineal.

El trabajo experimental de esta tesis consta de dos fases, las cuales se exponen en los capítulos 3 y 4. El capítulo 3 consiste en implementar una nueva técnica de microscopía no-lineal de fluorescencia por excitación de dos fotones, cuya excitación está basada en una hoja de luz láser digital escaneada (denotada como DLSM). Se hace una breve introducción de los antecedentes a este trabajo, así como de la implementación del sistema DLSM, que

ha sido diseñado para trabajar en cuatro modalidades (en los regímenes lineal y no-lineal, utilizando haces Gaussianos o Bessel). Además se realiza una caracterización completa del sistema utilizando muestras en vivo de *Caernohabditis elegans* para realizar una comparación directa de cada una de las modalidades disponibles y mostrar las ventajas de cada una de ellas. Este trabajo fue realizado en colaboración con el grupo del Dr. Pablo Loza Álvarez del Instituto de Ciencias Fotónicas (ICFO) de Barcelona, España.

En contraste, en el capítulo 4 (la segunda fase experimental de esta tesis), se muestran los resultados obtenidos de la escritura y monitoreo de patrones en forma de guía de onda en una muestra de nanopartículas elongadas de plata incrustadas en una matríz de sílice. Para esto, se utilizó el sistema de microscopía no-lineal de barrido de GSA. Se hace un estudio del proceso de daño de las nanopartículas en función de la energía del láser, polarización y velocidad de escaneo (trabajo realizado en el CICESE).

Finalmente, en el capítulo 5 se muestran las conclusiones de esta tesis, separadas de acuerdo a las dos fases experimentales expuestas en los capítulos 3 y 4, respectivamente. Se concluye el capítulo con algunas propuestas para trabajo a futuro.

Capítulo 2

Fundamentos teóricos

Si bien el trabajo de tesis que aquí se presenta es un trabajo experimental, para su comprensión es necesario conocer diversos fundamentos básicos de la óptica no-lineal tales como la fluorescencia inducida por el proceso de absorción de dos fotones y la generación de segundo armónico. Asimismo dado que aquí se realiza un estudio sobre el daño inducido en muestras de nanopartículas metálicas con un láser pulsado, también es necesario comprender los fundamentos básicos de plasmónica y los efectos térmicos inducidos en la materia por este tipo de fuentes. Cabe mencionar que el objetivo de este capítulo es hacer una breve descripción de estos procesos para poner en contexto la discusión de resultados en los capítulos 3 y 4 de esta tesis.

2.1 Descripción clásica de la óptica lineal y no-lineal: Modelo de Lorentz

Para hablar de la óptica en general es importante saber cómo interaccionan las ondas electromagnéticas con la materia. Esto se puede explicar de manera clásica desde un punto de vista electromagnético usando el modelo de Lorentz. Este modelo describe la interacción de la radiación con la materia considerando que los átomos que la componen se comportan como osciladores armónicos. Es decir, explica el efecto que tiene el campo electromagnético de la luz sobre los electrones dentro del material, considerando a cada átomo (o molécula) como un dipolo oscilante formado por una carga positiva y otra negativa unidas por un resorte (ver figura 3). Lo fascinante de este modelo es que se puede explicar tanto la interacción lineal como la no-lineal de la radiación con la materia, descritos a continuación.

2.1.1 Óptica lineal

Cuando incide una onda electromagnética sobre un material, en una primera aproximación, el desplazamiento de las cargas es proporcional al campo eléctrico de la onda ($\vec{r} \propto \vec{E}_0$), teniéndose así el régimen lineal de la óptica. El campo incidente oscila a frecuencias ópticas e induce dipolos pequeños en el material, los cuales oscilan armónicamente a la misma frecuencia de la luz incidente. Como resultado, el campo electromagnético que emite cada uno de los dipolos excitados se superpone al campo original modificando su propagación pero no su frecuencia. Ante el movimiento de los electrones existe una fuerza de restauración que une a los átomos dada por $\vec{F} = -k\vec{r}$, donde k es una constante (ver figura 3).

La ecuación de movimiento del electrón se expresa por

$$-k\vec{r} + m\gamma\dot{\vec{r}} + e\vec{E}(t) = m\ddot{\vec{r}}, \tag{1}$$

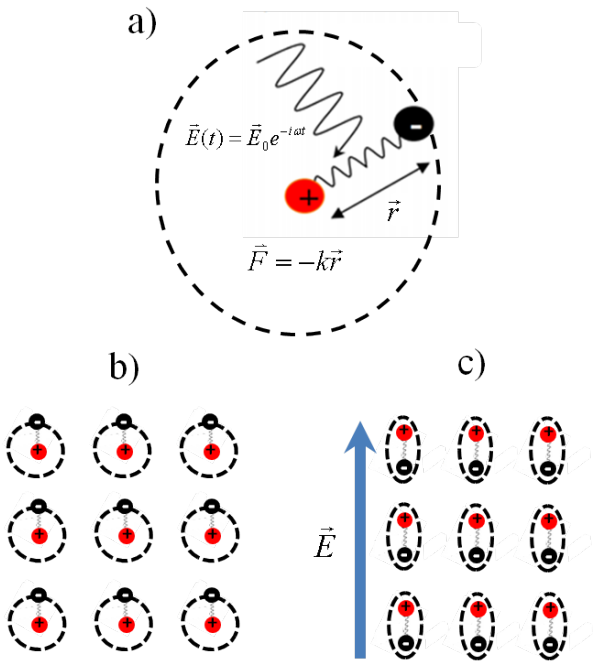

Figura 3. a) Modelo de Lorentz. Medio sin campo eléctrico incidente (b) y bajo la influencia de un campo eléctrico $\vec{E}$ incidente (c).

donde m es la masa del electrón, $\vec{r}$ es la distancia entre las cargas, e es la carga del electrón y $\vec{E}(t)$ el campo eléctrico de la onda incidente. En esta ecuación el primer término representa la fuerza de restauración, el segundo término representa la fuerza de amortiguamiento del movimiento del electrón (la cual hace que la amplitud de vibración del dipolo sea siempre finita) y finalmente el tercer término expresa la segunda ley de Newton.

Considerando un campo eléctrico de onda monocromática dado por $\vec{E}(t) = \vec{E_0}e^{-i\omega t}$, la solución de la ecuación de movimiento del electrón (1) es (Rangel-Rojo, 2001)

$$\vec{r}(t) = -e\frac{\vec{E}_0}{m}\frac{e^{-i\omega t}}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\omega\gamma}, \tag{2}$$

donde ω_0 es la frecuencia natural o de resonancia del resorte dada por $\omega_0^2 = \frac{k}{m}$.

La oscilación de las cargas que ocurre en un material se puede describir por medio de la polarización $\vec{P}$ que representa la suma de los momentos dipolares atómicos por unidad de volumen, $\vec{P} = -Ne\vec{r}$, siendo N la densidad de osciladores por unidad de volumen. Por lo tanto

$$\vec{P}(t) = \frac{Ne^2\vec{E}_0}{m}\frac{e^{-i\omega t}}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\omega\gamma}. \tag{3}$$

Desde un punto de vista macroscópico, la polarización lineal de un medio isotrópico y homogéneo está dada por

$$\vec{P}(t) = \varepsilon_0\chi^{(1)}\vec{E}(t). \tag{4}$$

en donde ε_0 es la permitividad del vacío y $\chi^{(1)}$ es la susceptibilidad eléctrica de primer orden del medio. La ecuación (4) nos dice que el grado de polarización de un material depende linealmente con el campo eléctrico al cual está sujeto. A mayor susceptibilidad de un material, mayor será su habilidad para polarizarse con el campo eléctrico. De las ecuaciones (3) y (4) se puede obtener que la susceptibilidad de primer orden está dada por

$$\chi^{(1)} = \frac{Ne^2}{m\varepsilon_0}\frac{1}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\omega\gamma} = \chi^{(1)'} + i\chi^{(1)''}, \tag{5}$$

donde $\chi^{(1)'}$ está relacionada con los fenómenos de refracción y birrefringencia, mientras que $\chi^{(1)''}$ con el fenómeno de absorción.

2.1.2 Óptica no-lineal

Cuando el campo de la luz es muy intenso, el desplazamiento de las cargas en el material ya no siguen solamente al campo incidente $\vec{E}(t)$. Debido a la energía impregnada a los átomos se inducen dipolos que oscilan "anarmónicamente" con la frecuencia del campo incidente. El movimiento anarmónico de los dipolos emite radiación electromagnética a nuevas frecuencias cuya amplitud no es proporcional al campo incidente, generando así los fenómenos ópticos no-lineales.

En el modelo de Lorentz, cuando la intensidad del haz incidente es alta, la fuerza de restitución está dada por $\vec{F} = -k\vec{r} - k_2\vec{r}^2 - \cdots - k_j\vec{r}^j$ y por tanto la ecuación del movimiento es

$$-k\vec{r} + k_2\vec{r}^2 + \ldots + k_j\vec{r}^j + m\gamma\dot{\vec{r}} + e\vec{E}(t) = m\ddot{\vec{r}}. \tag{6}$$

cuya solución es la combinación lineal

$$\vec{r}(t) = \vec{r}_0 e^{-i\omega t} + \vec{r}_1 e^{-i2\omega t} + \cdots + \vec{r}_{j-1} e^{-ij\omega t}. \tag{7}$$

En esta solución se observa el comportamiento no-lineal del resorte mediante la generación de *j-armónicos* proporcionales a la frecuencia fundamental ω de la onda incidente. La contribución al desplazamiento del electrón en cada armónico generado está dada por las variables, $\vec{r}_0$, $\vec{r}_1$, etc., las cuales son funciones que dependen de la frecuencia de oscilación y de la frecuencia natural de los dipolos.

En este caso, la polarización macroscópica se representa mediante una expansión en serie de Taylor de la forma

$$\vec{P}(t) = \varepsilon_0 \left[\chi^{(1)} \cdot \vec{E}(t) + \chi^{(2)} : \vec{E}\vec{E} + \chi^{(3)} \vdots \vec{E}\vec{E}\vec{E} + \cdots + \chi^{(j)} \vec{E}^j \right], \tag{8}$$

donde $\chi^{(j)}$ son los tensores de susceptibilidades no-lineal de orden j ($j \geq 2$).

Precisamente, los procesos ópticos se clasifican de acuerdo al orden de la susceptibilidad eléctrica que presente el medio ($\chi^{(j)}$). Por ejemplo, como ya se explicó en la sección anterior, una $\chi^{(1)}$ origina fenómenos ópticos de primer orden a los que llamamos fenómenos (procesos) ópticos lineales, tales como la absorción, la reflexión y la dispersión. Una $\chi^{(2)}$ origina procesos no-lineales de segundo orden, tales como el efecto Pockels, la mezcla de tres ondas y la generación del segundo armónico. Por otro lado, una $\chi^{(3)}$ origina procesos no-lineales de tercer orden, como el efecto Kerr, el efecto Raman, la mezcla de cuatro ondas, la generación del tercer armónico y la fluorescencia por excitación de dos fotones.

La expresión (8) es una serie de potencias en $\vec{E}$, para que esta serie converja a un valor finito, en ciertos casos se requiere que $\chi^{(j)}\vec{E}^j < \chi^{(j-1)}\vec{E}^{j-1}$, o bien que $\chi^{(j)} < \chi^{(j-1)}/\vec{E}$, es decir, las $\chi^{(j)}$ son cada vez más pequeñas. Por lo tanto, para observar fenómenos ópticos debidos a las no-linealidades de orden mayor necesitamos utilizar intensidades mayores. No obstante, existen materiales en los que diferentes procesos ópticos no-lineales pueden estar presentes. En estos casos existen factores físicos que los hacen distinguibles tanto en la excitación (polarización) como en la emisión del proceso (empatamiento de fase y longitud de onda), y gracias a esto han surgido diversas ramas de la microscopía no-lineal basadas en diferentes procesos ópticos no-lineales. En particular, la fluorescencia inducida por excitación de dos fotones y la generación de segundo armónico son dos variantes de la microscopía no-lineal y, dado que son tema central en esta tesis, se describen a continuación con más detalle.

2.2 Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF)

La fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF) es un proceso no-lineal de tercer orden y fue predicha en 1931 por Maria Göpert-Mayer en su tesis doctoral (Göppert-Mayer, 1931), en la cual demuestra que se puede llegar a un estado excitado por la absorción suscesiva de dos fotones mediante estados virtuales intermedios. De hecho, las unidades de la sección transversal de absorción de dos fotones ($\sigma^{(2)}$) se dan en GM (Göpert-Mayer; 1 GM=10^{-50} $cm^4 s/fotones$).

Para entender mejor el proceso de TPEF, primero se hace referencia al proceso de fluorescencia por excitación de un fotón (1PEF) mostrado en la figura 4a. En este caso un fotón de energía E_{exc} se absorbe en el medio provocando que un electrón pase del estado electrónico base S_0, al estado electrónico excitado superior S_1. Después el electrón decae a estados vibracionales de menor energía dándose una disipación de energía (generalmente en forma de calor) y finalmente decae al estado electrónico base S_0, emitiendo un fotón cuya energía es menor (i.e, longitud de onda mayor) que el fotón de excitación. Es importante mencionar que para cada uno de los estados electrónicos (S_0 y S_1), el electrón puede estar en algún estado vibracional excitado; indicado por las líneas segmentadas en la figura 4a. La transición desde S_1 hasta S_0 se da en tiempos del orden de nanosegundos y picosegundos (Lakowicz, 2007). El proceso de 1PEF típicamente requiere fuentes de luz en el ultravioleta o en el visible (400-600 nm) para excitar el material de interés.

Sin embargo, el mismo proceso de transición del electrón del estado electrónico base S_0, al estado electrónico excitado S_1, también puede darse mediante la absorción simultánea de dos fotones de menor energía (típicamente en el rango espectral del infrarrojo cercano) como se muestra en la figura 4b. Este proceso no-lineal ocurre solamente si la suma de las energías de los dos fotones es mayor a la energía de la brecha (E_g) entre los estados electrónicos

S_0 y S_1 del material. La capacidad del material de absorber la luz de excitación y de emitir la luz de fluorescencia están representados por los espectros de absorción y de emisión, respectivamente. En este sentido, existen materiales fluorescentes denominados fluoróforos y se caracterizan por sus espectros de absorción y de emisión. Por ejemplo, en la figura 4c se muestran los espectros de absorción y de emisión para la proteína fluorescente cyan (CFP). Normalmente, los espectros de absorción y emisión son imágenes de espejo una de otra.

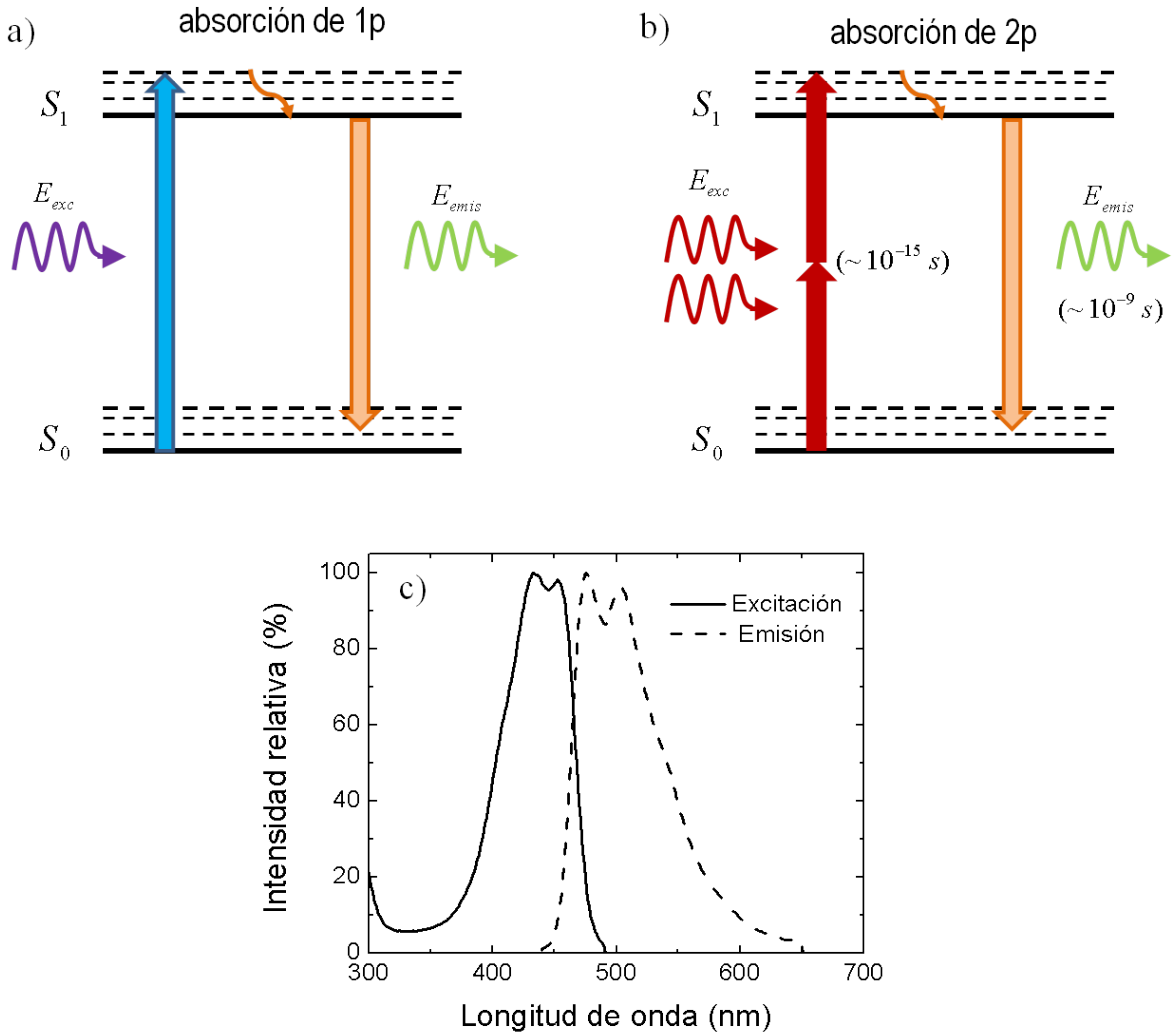

Figura 4. Diagrama de energía para los procesos de absorció de a) un fotón y b) dos fotones. c) Espectros de absorción y de emisión de la proteína fluorescente cyan (CFP).

Para que se lleve a cabo el proceso de absorción de dos fotones, ambos fotones deben de llegar al fluoróforo en un rango de tiempo de alrededor de 10^{-15} segundos (Louisell, 1973). Por lo tanto, para inducir TPEF de manera eficiente se requiere un flujo de fotones extremadamente alto, típicamente del orden de $10^{20} - 10^{30}$ fotones/$(cm^2 s)$ (Kaiser y Garrett, 1961). Para lograr este flujo alto de fotones en tiempos ultracortos, se utilizan láseres de Ti:zafiro que emiten pulsos de femtosegundos ($10 - 100$ fs) en el infrarrojo con una frecuencia de repetición de alrededor de 100 MHz. La principal característica de los pulsos de estos láseres, es que aun cuando la potencia pico del pulso sea extremadamente alta, la energía por pulso es moderadamente baja, esto debido a que la energía se concentra en un intervalo de tiempo muy corto. Además, si el haz láser se enfoca en una área relativamente pequeña mediante un objetivo de microscopio de apertura numérica grande, la probabilidad de inducir el proceso de absorción multifotónica se incrementa, ya que la probabilidad de encontrar dos fotones en el mismo lugar al mismo tiempo es mayor.

Para TPEF, la intensidad de fluorescencia está dada por (Diaspro *et al.*, 2005)

$$I_f(t) = \kappa \sigma^{(2)} \eta I(t)^2 = \kappa \pi \sigma^{(2)} \eta P(t)^2 \left[\frac{(NA)^2}{hc\lambda_{exc}} \right]^2, \tag{9}$$

donde κ es un factor que toma en cuenta la eficiencia de colección del arreglo experimental de TPEF. La sección transversal de absorción de dos fotones y la eficiencia cuántica de emisión están representadas por $\sigma^{(2)} = \sigma^{(2)}(\lambda_{exc})$ y $\eta = \eta(\lambda_{emi})$, respectivamente. La intensidad de excitación está dada por $I(t) = \lambda_{exc} P(t)/(hcA)$, donde *P(t)* es la potencia en el área iluminada $A \cong \pi[\lambda_{exc}/(2NA)]^2$, NA es la apertura numérica del objetivo de microscopio y h y c son la constante de Planck y la velocidad de la luz en el vacío, respectivamente (Born y Wolf, 1993).

Considerando un láser de femtosegundos con una frecuencia de repetición f_p, y una duración de pulso τ_p, la potencia promedio depende de la potencia pico a través de -

$P_{prom} = \tau_p f_p P_{pico}$. Por lo tanto, la ecuación (9) se convierte en (So *et al.*, 2000):

$$< I_{f,p} > \cong \sigma^{(2)} \eta \frac{P_{prom}^2}{\tau_p f_p} \left[\frac{(NA)^2}{hc\lambda_{exc}} \right]^2 . \tag{10}$$

De la ecuación (10) se puede notar que la intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a τ_p y proporcional a NA^4. Es decir, la intensidad de fluorescencia se incrementa al utilizar pulsos ultracortos y objetivos con una apertura numérica grande. Estas características son útiles en la microscopía no-lineal.

2.3 Generación de segundo armónico (GSA)

La generación del segundo armónico (GSA), es un proceso óptico no-lineal de segundo orden mediante el cual se duplica la frecuencia de una onda monocromática incidente. En materiales gruesos (es decir, grosores $>> \lambda_{exc}$) los procesos no-lineales de segundo orden son difíciles de obtener debido a la dispersión que provoca el índice de refracción tanto en las ondas 2ω que se generan a lo largo del medio no-lineal como en la señal incidente ω; es decir, estas se desfasan entre sí e interfieren destructivamente, haciendo deficiente el proceso de conversión de frecuencias.

Desde el punto de vista de la mecánica cuántica, un medio no-lineal tiene la capacidad de aniquilar y crear fotones. Para el caso específico de GSA la aniquilación de dos fotones que tienen una misma energía $\hbar\omega$ (donde $\hbar = h/2\pi$; con h la constante de Planck) provoca la creación de un fotón que tiene el doble de energía, como se muestra en la Figura 5.

Esta transformación cumple en todo momento las siguientes leyes de conservación de la energía y del momento:

$$\hbar\omega + \hbar\omega = \hbar 2\omega, \tag{11}$$

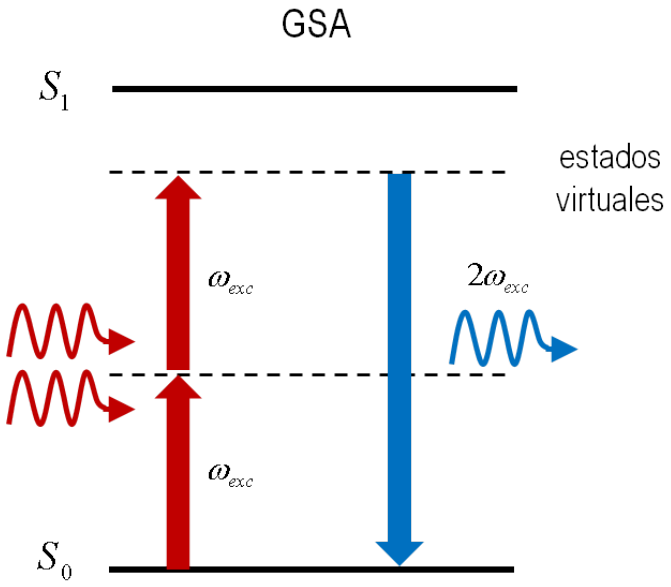

Figura 5. Diagrama de Jablonski para la descripción cuántica de la generación de segundo armónico. Las líneas segmentadas indican estados electrónicos virtuales.

y

$$\hbar\vec{k}_{\omega} + \hbar\vec{k}_{\omega} = \hbar\vec{k}_{2\omega}, \tag{12}$$

donde $\vec{k}_{\omega} = \hat{s}n_{\omega}\omega/c$ es el vector de onda del haz incidente y $\hat{s}$ es el vector unitario que indica la propagación del fotón. En un caso en el que tanto el haz incidente y el haz generado se propagan en la misma dirección (caso colineal), la conservación del momento implica que $\hbar\frac{\omega}{c}n_{\omega} + \hbar\frac{\omega}{c}n_{\omega} = \hbar\frac{2\omega}{c}n_{2\omega}$ y por tanto que $n_{\omega} = n_{2\omega}$. No obstante, es imposible que se cumpla esta condición de empatamiento de fases en medios isotrópicos ya que el índice de refracción depende de la longitud de onda (dispersión). Sin embargo, esta condición sí se puede cumplir en medios anisotrópicos como los cristales uniaxiales (Ducuing y Bloembergen, 1964).

En general, la intensidad de la generación del segundo armónico $I_{2\omega}$, en función de la longitud L del medio está dada por la siguiente expresión (Robles Agudo, 2005):

$$I_{2\omega}(L) \propto \left[\frac{\omega L \chi_{ef}^{(2)}}{n_{2\omega} c}\right]^2 I_{\omega}^2 sinc^2\left(\frac{\Delta k L}{2}\right), \tag{13}$$

donde ω es la frecuencia angular de la onda incidente, $\chi_{ef}^{(2)}$ es la susceptibilidad efectiva de segundo orden del material, dependiente del estado de polarización de las ondas involucradas en el proceso, $n_{2\omega}$ es el índice de refracción del medio a la frecuencia 2ω, c es la velocidad de la luz, I_{ω} es la intensidad de la onda incidente y $\Delta k = k_{2\omega} - 2k_{\omega}$, es la magnitud del momento resultante entre la diferencia del vector de onda de la luz incidente k_{ω}, y el vector de onda de segundo armónico generada $k_{2\omega}$, cuyas magnitudes están dadas por $k_{\omega} = n_{\omega}\omega/c$ y $k_{2\omega} = n_{2\omega}\omega/c$, respectivamente, con n_{ω} el índice de refracción a la frecuencia fundamental ω. El término $sinc^2\frac{\Delta k L}{2}$ modula la intensidad del segundo armónico en función del defasamiento $\Delta k L/2$ adquirido entre las ondas del segundo armónico y la onda incidente a lo largo del medio no lineal de longitud L. Ambas ondas generalmente se propagan en forma colineal. Nótese que la máxima conversión del segundo armónico se obtiene cuando $\Delta k L = 0$ lo que ocurre cuando los índices de refracción del medio a las frecuencias ω y 2ω son iguales ($n_{\omega} = n_{2\omega}$); a esta condición se le conoce como empatamiento de fases entre las ondas y es uno de los factores físicos que distinguen al proceso de GSA de la TPEF.

2.3.1 GSA en microscopía no-lineal

La microscopía de GSA en materiales biológicos y nanoestructurados ocurre por lo general sin que se cumpla la condición perfecta para el empatamiento de fases, $\Delta k = 0$. No obstante, debido al gran enfocamiento comúnmente utilizado en microscopía no-lineal, la interacción entre los haces de excitación y de segundo armónico se concentra en una región volumétrica del orden de la longitud de onda de excitación $L_{foco} \to \lambda$ (en este caso dada por la resolución axial). Esta condición de mínima interacción es útil para considerar que los efectos de modu-

lación en la intensidad del GSA a lo largo de la muestra por empatamiento de fase sean despreciados.

Considerando lo anterior y agregando el carácter pulsado del haz, la ecuación (13) puede expresarse como (Campagnola *et al.*, 2002):

$$I_{2\omega} \propto \left[\frac{\rho}{a\tau_p}\right]^2 \tau_p(\chi^{(2)})^2 a, \tag{14}$$

donde ρ es la energía del pulso de luz láser, a es el área de enfoque y τ_p es el ancho del pulso. Por lo tanto, para muestras delgadas la susceptibilidad no-lineal de segundo orden, $\chi^{(2)}$, depende principalmente de la estructura molecular del medio y por tanto de la polarización de la luz. Además, otras dos características importantes que se deducen del paréntesis cuadrado de la ecuación (14) son, por un lado, la dependencia cuadrática con la intensidad de la radiación incidente, donde se puede apreciar que a menor área de enfoque mayor la intensidad incidente y por ende mayor generación de segundo armónico. Por otro lado, el segundo armónico es inversamente proporcional al ancho del pulso. Esto es, a menor tiempo de duración de un pulso mayor la señal de segundo armónico. Nuevamente, estas características son de utilidad para la resolución axial y con ello el carácter confocal de la microscopía no-lineal

2.3.2 GSA en nanopartículas de plata

En nuestro grupo de investigación recientemente se estudió (experimental y teóricamente) la dependencia de la señal de GSA en una capa delgada de NPs-Ag elongadas incrustadas en sílice en función de la polarización del haz de excitación y de la orientación de la muestra (Rocha-Mendoza *et al.*, 2011). Los resultados experimentales fueron modelados considerando a la capa delgada de NPs-Ag como un medio conformado por NPs, las cuales poseen un tensor

de hiperpolarizabilidad con simetría cílindrica a lo largo del eje mayor de las NPs. En las simulaciones de ese trabajo se consideró que la susceptibilidad macroscópica de segundo orden ($\chi^{(2)}_{ijk}$) de la capa delgada de NPs-Ag se origina por la suma coherente de las hiperpolarizabilidades microscópicas asociadas a cada una de las nanopartículas. Es decir, matemáticamente se tiene que

$$\chi^{(2)}_{ijk} = N \sum \langle R_{ijk,i'j'k'} \rangle \beta_{i'j'k'}, \tag{15}$$

donde N es el número de NPs contenidas en el volumen iluminado por el haz de excitación, $\beta_{i'j'k'}$ es el tensor de hiperpolarizabilidad de las NPs, y $R_{ijk,i'j'k'}$ son los elementos de la matriz de rotación de Euler que transforma el sistema coordenado de la hiperpolarizabilidad $\beta_{i'j'k'}$ de las NPs al sistema coordenado del laboratorio (i,j,k=x,y,z).

Como resultado final se entiende que la intensidad total del segundo armónico es proporcional a la suma de las susceptibilidades efectivas para las polarizaciones p ($\chi^{(2)}_{ef,p\varphi}$) y s ($\chi^{(2)}_{ef,s\varphi}$), es decir

$$I_{GSA} \propto |\chi^{(2)}_{ef}|^2 = |\chi^{(2)}_{ef,p\varphi}|^2 + |\chi^{(2)}_{ef,s\varphi}|^2, \tag{16}$$

con

$$\begin{aligned} \chi^{(2)}_{ef,p\varphi} = & -\frac{1}{4} a sin2\varphi sin\Phi(cos\Phi + sin^2\Phi) r \\ & + \frac{\sqrt{2}}{2} a cos^2\varphi sin^2\frac{\Phi}{2}(r sin^2\Phi + cos^2\Phi) \\ & - \frac{\sqrt{2}}{4} abcos\Phi sin^2\Phi(1 - \frac{1}{2}cos^2\varphi) \\ & + \frac{1}{4} a sin2\varphi sin2\Phi sin^2\frac{\Phi}{2}, \end{aligned} \tag{17}$$

para polarización p y

$$\chi^{(2)}_{ef,s\varphi} = -\frac{\sqrt{2}}{4}asin^2\varphi sin^3\Phi - \frac{\sqrt{2}}{4}sin\Phi(1+cos^2\Phi)r$$
$$-\frac{\sqrt{2}}{4}sin\Phi cos^2\varphi(cos\Phi - sin^2\Phi)r$$
$$+\frac{1}{2}asin2\varphi(cos^2\Phi sin^2\frac{\Phi}{2}r + sin^2\Phi cos^2\frac{\Phi}{2})$$
$$+\frac{\sqrt{2}}{2}acos^2\varphi sin\Phi cos\Phi sin^2\frac{\Phi}{2}, \quad (18)$$

para polarización s, respectivamente.

En las ecuaciones (17) y (18), Φ es el ángulo de rotación hecho por la proyección del eje mayor de las NPs sobre el plano xy y el plano de incidencia contenido en xy, φ es el ángulo de polarización del haz incidente (ver figura 6a), a, b y r son parámetros de ajuste (ver (Rocha-Mendoza *et al.*, 2011)).

Los experimentos de GSA se realizaron en reflexión y se utilizó un láser de Ti:zafiro que emite pulsos de 88 fs centrados en 830 nm y con una taza de repetición de 94 MHz (este mismo láser se utilizó en los experimentos reportados en el capítulo 4). La configuración experimental para GSA en reflexión se muestra en la figura 6, en donde k_ω y $k_{2\omega}$ son las direcciones de los haces de excitación y de la señal de GSA, respectivamente; p y s son las polarizaciones lineales paralela y perpendicular del haz incidente con respecto al plano de incidencia, respectivamente; y θ_{inc} es el ángulo de incidencia que hace la dirección de propagación del haz incidente y la normal ($\hat{n}$) a la superficie.

Para el caso particular en que $\Phi = 180°$, se tiene que las ecuaciones (17) y (18) se reducen a

$$\chi^{(2)}_{ef,p\varphi} = \frac{\sqrt{2}a}{2}cos^2\varphi \quad (19)$$

y

$$\chi^{(2)}_{ef,s\varphi} = \frac{ar}{2}sin2\varphi, \quad (20)$$

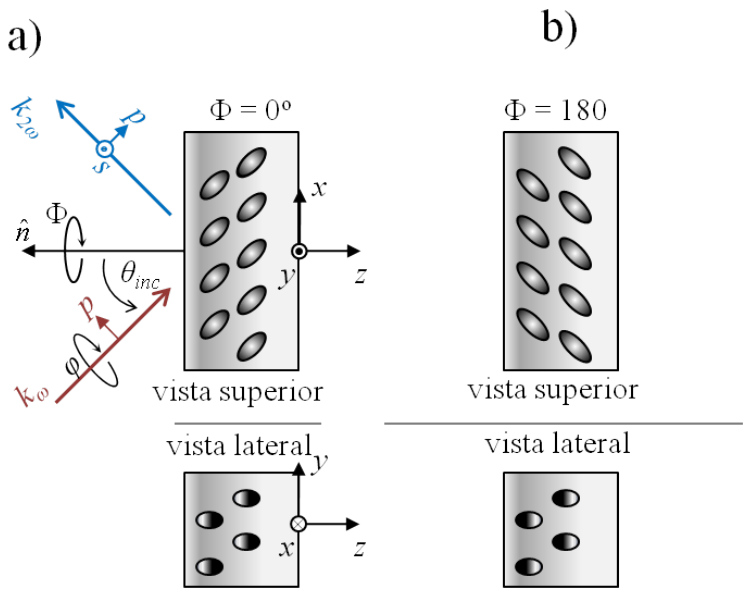

Figura 6. a) Configuración del experimento de GSA en reflexión hecho por (Rocha-Mendoza *et al.*, 2011). b) Orientación de la muestra de NPs-Ag elongadas para $\Phi = 180$ con respecto al sistema coordenado (x,y,z) del laboratorio.

respectivamente. La figura 7 muestra la dependencia polar obtenida con las ecuaciones (19) y (20) de la intensidad de GSA (total y para ambas polarizaciones) de las NPs-Ag elongadas. En el modelado se consideraron $1/r = 1.4$ y $a = 34$.

En la figura 7a se puede ver una buena correlación entre el experimento y la simulación, donde la mayor contribución a la intensidad total de GSA es cuando el haz láser tiene una polarización p, es decir, cuando coincide con la proyección del eje mayor de las NPs. En contraste, para el caso de las NPs-Ag esféricas se obtuvieron solo las trazas experimentales mostradas en la figura 7b. En este caso, la componente I_p domina la señal de GSA atribuida a la componente dipolar superficial de las NPs. Notando que la señal de GSA no se cancela debido a que las NPs no son perfectamente esféricas (Nappa *et al.*, 2005; Bachelier *et al.*, 2010).

En este contexto, una parte del trabajo que comprende esta tesis consiste en utilizar un

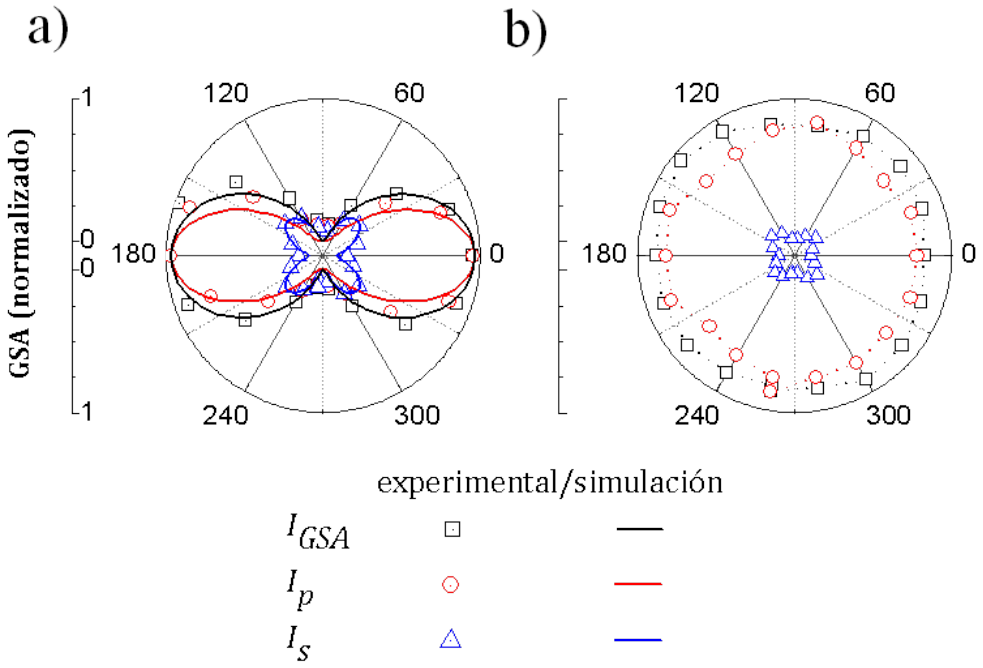

Figura 7. a) Dependencia polar simulada y experimental de la intensidad de GSA de las NPs-Ag elongadas para $\Phi = 180°$. b) Dependencia polar experimental de la intensidad de GSA para NPs-Ag esféricas. En las gráficas las intensidades experimentales de GSA total, para la polarización p y s se denotan por los cuadrados negros, círculos rojos y triángulos azules, respectivamente. Mientras que las intensidades de GSA simuladas se representan por líneas sólidas con las misma convención de color.

sistema de microscopía no-lineal de GSA para: 1) visualizar la señal de GSA generada en las capas de NPs-Ag elongadas incrustadas en sílice y 2) para escribir y monitorear patrones de estructuras fotónicas. En este caso la excitación es a incidencia normal y la señal de GSA se detecta en transmisión.

2.4 Conceptos básicos de plasmónica

Como ya hemos mencionado, en esta tesis se utilizan muestras de nanopartículas de plata embebidas en vidrio y en consecuencia no es sorprendente que presenten absorción de origen plasmónico. Por tal motivo, en esta sección se hace una breve descripción de los conceptos

básicos de plasmónica, tales como el plasmón polaritón de superficie, el plasmón localizado en partículas esféricas y el plasmón localizado en nanocilindros. Los desarrollos matemáticos asociados a cada caso no se muestran aquí, ya que están fuera del propósito de esta tesis, en cuyo caso se recomienda ver (Maier, 2007; Khlebtsov, 2008).

2.4.1 Plasmón polaritón de superficie

En general, en un plasmón-polaritón de superficie (PPS) el campo electromagnético de la luz de excitación se acopla a las oscilaciones de plasma de los electrones localizados en la frontera entre el metal y el dieléctrico y se propagan por la interfaz como una onda. Como se muestra en la figura 8, esta propagación tiene líneas de campo que penetran en ambos medios y decae en la dirección $\hat{x}$.

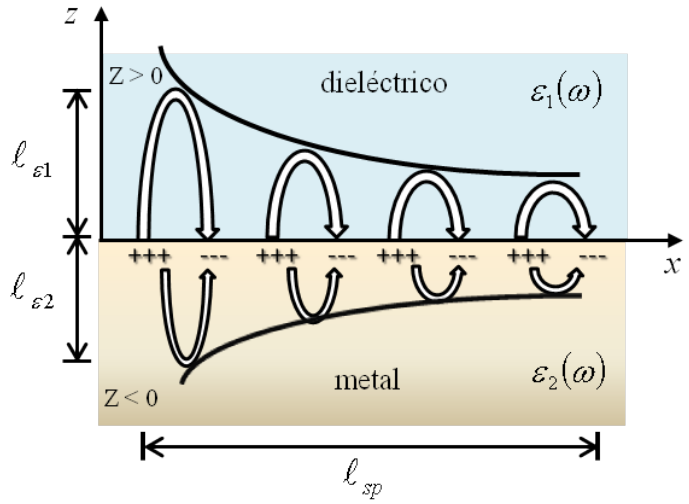

Figura 8. Líneas de campo debido a un plasmón en una interfaz metal-dieléctrico. La longitud de propagación a la cual la intensidad del PPS cae a $1/e$ en la dirección $\hat{x}$ se representa por ℓ_{sp}; y las constantes de decaimiento en la dirección perpendicular a la superficie (dirección $\hat{z}$) para los medios 1 y 2 están dadas por $\ell_{\varepsilon 1}$ y $\ell_{\varepsilon 2}$, respectivamente.

Las condiciones necesarias para que dicho acoplamiento sea posible en la interfaz se encuentran resolviendo las ecuaciones de Maxwell para los modos transversal eléctrico (TE) y

transversal magnético (TM) del campo electromagnético. Mientras que para el caso TE se llega a que no existen PPSs en polarización s, para el caso TM (polarización p) sí existen y se encuentran considerando campos de la forma (Maier, 2007)

$$H_1(x) = H_0 e^{ik_{ps}x} e^{-\beta_1(k_{ps})z} \tag{21}$$

para $z > 0$ y

$$H_2(x) = H_0 e^{ik_{ps}x} e^{\beta_2(k_{ps})z} \tag{22}$$

para $z < 0$. Aquí, k_{ps} es la constante de propagación de las ondas de superficie y está dada por

$$k_{ps} = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon_1\varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}}, \tag{23}$$

donde ω y c son la frecuencia del campo incidente y la velocidad de la luz en el vacío, respectivamente; asimismo ε_1 y ε_2 son las constantes dieléctricas del medio 1 (dieléctrico) y medio 2 (metal), respectivamente. A la ecuación (23) se le conoce como relación de dispersión y se llega a ella considerando condiciones de frontera y de continuidad en la superficie.

Los parámetros $\beta_{1,2}(k_{sp})$ de las ecuaciones (21) y (22) representan el decaimiento de las ondas superficiales (PPSs) en la dirección $\hat{z}$ y están dados por

$$\beta_{1,2}(k_{sp}) = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{-\varepsilon_{1,2}^2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}}. \tag{24}$$

La longitud de propagación (ℓ_{sp}) a la cual la intensidad del PPS cae a $1/e$ en la dirección $\hat{x}$ es

$$\ell_{sp} = \frac{1}{2k''_{sp}}, \tag{25}$$

donde $k''_{sp} = Im\{k_{ps}\}$. Por ejemplo, para la sílice $\varepsilon_1 = 3.8$ y la plata $\varepsilon_2 = -34.2 + 1.17i$ en 850 nm (Ordal *et al.*, 1983), se tiene que $\ell_{sp} = 15\ \mu m$.

Por otro lado, las constantes de decaimiento (ℓ_ε) en la dirección perpendicular a la superficie (dirección $\hat{z}$) para los medios 1 y 2 están dadas por (Maier, 2007)

$$\ell_{\varepsilon 1,2} = \frac{1}{|Im\{\beta_{1,2}\}|}. \tag{26}$$

Si se considera una interfaz sílice-plata como en el caso anterior, se tiene que $\ell_{\varepsilon 1} = 0.19\ \mu m$ y $\ell_{\varepsilon 2} = 0.021\ \mu m$, siendo más fuerte el decaimiento en el metal.

2.4.2 Plasmones localizados en partículas esféricas y cilíndricas

Para el caso de una partícula esférica isotrópica de radio a (menor a una longitud de onda) sumergida en un medio sujeto a un campo electromagnético externo, la polarizabilidad electrostática de la partícula esta dada por (Khlebtsov, 2008)

$$\alpha = a^3 \frac{\varepsilon_{part} - \varepsilon_{medio}}{\varepsilon_{part} + 2\varepsilon_{medio}}, \tag{27}$$

donde ε_{part} y ε_{medio} son las permitividades de la partícula y del medio, respectivamente. De la ecuación (27), se tiene que la resonancia del sistema se da cuando

$$\varepsilon_{part} = -2\varepsilon_{medio}. \tag{28}$$

Considerando el modelo de Drude para partículas muy pequeñas ($a << \lambda$) la frecuencia de resonancia del plasmón (ω_{max}) y su correspondiente longitud de onda (λ_{max}) están dadas por (Bohren y Huffman, 1983)

$$\omega_{max} = \frac{\omega_p}{\sqrt{\varepsilon_{ib} + 2\varepsilon_{medio}}} \tag{29}$$

y

$$\lambda_{max} = \lambda_p \sqrt{\varepsilon_{ib} + 2\varepsilon_{medio}}, \tag{30}$$

respectivamente; donde ε_{ib} es la contribución de las transiciones electrónicas interbanda, ω_p y λ_p son la frencuencia y la longitud de onda de plasma, respectivamente. Para la plata se tiene que $\omega_p \approx 1.37 \times 10^{16}$ rad/s y $\lambda_p \approx 138$ nm. Así por ejemplo, si se considera que el medio es sílice con $\varepsilon_{medio} = 1.5$ y en una primera aproximación $\varepsilon_{ib} \approx 1$, se tiene que $\omega_{max} \approx 6.85 \times 10^{15}$ rad/s y $\lambda_{max} \approx 276$ nm. Sin embargo, es importante mencionar que según las mediciones experimentales la frecuencia de excitación del plasmón de superficie localizado en realidad es sensible a la geometría, tamaño y composición de la nanopartícula en cuestión. En el caso particular de las nanopartículas de plata con geometría esférica, la resonancia del plasmón se desplaza hacia longitudes de onda mayores y se ensancha a medida que se incrementa el diamétro de la nanopartícula tal y como se muestra en la figura 9a [1]. En el caso particular de nanopartículas de plata con geometría elipsoidal como las que aquí se estudian, se ha observado que dicha resonancia se desdobla en dos picos debido a la diferencia de tamaño entre sus ejes (Rangel-Rojo *et al.*, 2009).

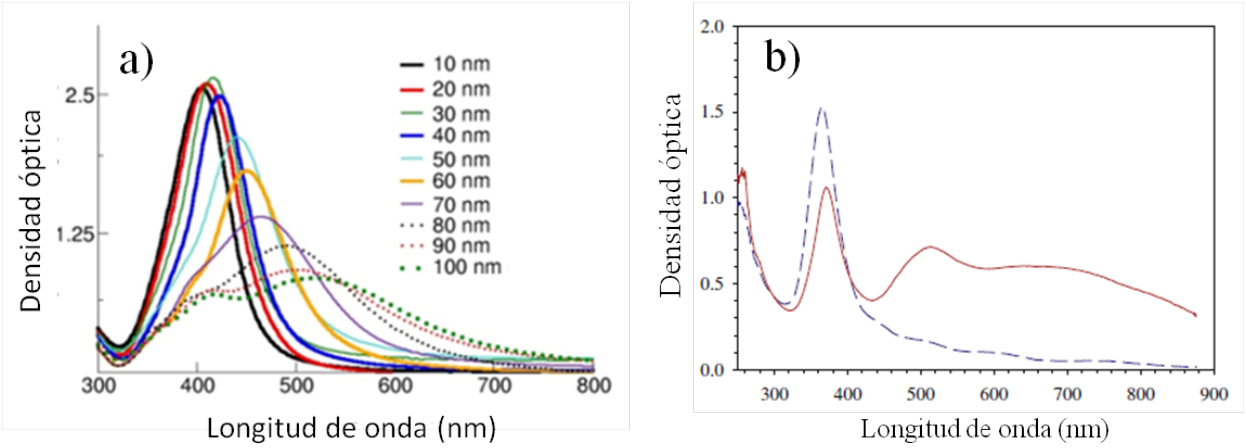

Figura 9. a) Espectros de absorción de NPs-Ag esféricas con diámetros en el rango de $10 - 100$ nm. b) Espectros de absorción de NPs-Ag elongadas para polarización paralela al eje mayor de las NPs-Ag, "p", (línea continua) y polarización perpendicular al eje mayor de las NPs-Ag, "s", (línea segmentada), imagen tomada de (Rangel-Rojo *et al.*, 2009).

[1] Tomada de http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html

Esto se puede explicar en primera aproximación cuando se considera el caso de NPs cilíndricas, en este caso se tiene que la polarizabilidad está dada por (Khlebtsov, 2008)

$$\alpha_{p,s} = \alpha_{a,b} = \frac{V}{4\pi} \frac{\varepsilon_{nanorod} - \varepsilon_{medio}}{\varepsilon_{nanorod} + (\varepsilon_{nanorod} - \varepsilon_{medio})\pounds_{p,s}}, \tag{31}$$

donde V es el volumen de la NP cilíndrica, $\varepsilon_{nanorod}$ y ε_{medio} son las permitividades de la partícula cilíndrica y del medio, respectivamente; $\pounds$ es un factor geométrico de depolarización proporcional al tamaño de los ejes a y b de la NP cílindrica y satisface la relación $\pounds_s + 2\pounds_p = 1$ y $\pounds = 1/3$ para esferas. De manera similar a la ecuación (30) se tiene que la resonancia para NPs cílindricas es

$$\lambda_s^{max} = \lambda_p \sqrt{\varepsilon_{ib} + (1/\pounds_s - 1)\varepsilon_{medio}}, \tag{32}$$

la cual predice el corrimiento de la resonancia hacia longitudes de onda mayor al incrementarse la razón de los tamaños de los ejes de las NPs.

2.5 Efectos térmicos inducidos por láseres pulsados

Cuando un haz láser incide en un medio (dieléctrico), parte de la luz se absorbe y la energía absorbida se convierte (con cierta eficiencia) en calor. En este caso, el origen de los efectos térmicos generados están relacionados con el tipo de láser (pulsado o continuo), la potencia de la luz láser incidente, con la estructura interna del medio y con la capacidad que tenga este último de absorber dicha luz. El incremento de la temperatura en la zona iluminada puede inducir desde un cambio en el índice de refracción del medio hasta un rompimiento dieléctrico causando daños irreversibles.

Con el fin de poner en contexto los resultados presentados en el capítulo 4, es de suma importancia tener en mente que los efectos térmicos son diferentes para láseres continuos y para láseres pulsados. Para el caso de láseres continuos, la potencia o la intensidad son los

parámetros relevantes, mientras que para los láseres pulsados lo son la energía por pulso, ó bien, la fluencia.

Los cambios en temperatura inducidos por un haz láser pueden describirse matemáticmanete mediante la siguiente expresión, que se le conoce como la ecuación de transporte de calor (Boyd, 2008)

$$\mathcal{C}_v \frac{\partial T}{\partial t} - \kappa \nabla^2 T = \alpha I(r), \tag{33}$$

donde $\mathcal{C}_v$ denota la capacidad calorífica a volumen constante, T es el cambio de temperatura inducido por el láser, κ es la conductividad térmica, α es el coeficiente de absorción lineal del material e I es la intensidad del haz láser incidente.

Considérese el caso en que un material metálico o dieléctrico sea iluminado con un láser de emisión continua (o pulsado) y en consecuencia se haya incrementado su temperatura a un valor T. Sin importar cómo sea el crecimiento de la temperatura a través del tiempo t, una vez que se haya apagado la fuente ($\alpha I(r) \to 0$), el tiempo t_r que le toma al medio para regresar a la temperatura a su valor estacionario (temperatura ambiente) se puede estimar de la ecuación (33) considerando $\partial T/\partial t \approx T/t_r$ y $\nabla^2 T \approx T/R^2$ con R el radio del haz. En este caso se tiene que

$$t_r \approx \frac{\mathcal{C}_v R^2}{\kappa}. \tag{34}$$

Por ejemplo considerando un haz de radio $R = 2\ \mu m$, para la sílice se tiene que $\mathcal{C}_{v,SiO_2} = 1.67 \times 10^6\ J/m^3K$, $\kappa_{SiO_2} = 1.4\ W/mK$; entonces se tiene que $t_r = 4.7\ \mu s$, mientras que para la plata $\mathcal{C}_{v,Ag} = 9.18 \times 10^3\ J/m^3K$ y $\kappa_{Ag} = 429\ W/mK$; por lo tanto $t_r = 85\ ps$. Es evidente que el tiempo que le toma a la plata para regresar a la temperatura ambiente una vez apagado el láser es varios órdenes de magnitud menor que para el caso de la sílice.

Siguiendo en el caso de un láser de emisión continua, bajo condiciones del estado estacionario, esto es, cuando ya no hay incremento en la temperatura con respecto al tiempo

($\partial T/\partial t \rightarrow 0$) y el incremento máximo de temperatura en el centro del haz láser (ΔT_c^{max}) puede ser considerado como $\nabla^2 T \approx -\Delta T_c^{max}/R^2$, la ecuación (33) se reduce a

$$\Delta T_c^{max} = \frac{\alpha I^{max} R^2}{\kappa}, \tag{35}$$

con I^{max} la intensidad en el centro del haz láser.

Para la sílice se tiene que $\alpha_{SiO_2} = 10 \times 10^{-4}\ m^{-1}$ (a 830 nm) y $\kappa_{SiO_2} = 1.4$ W/m°K, considerando una potencia CW de 150 mW y un haz de radio $R = 2\ \mu m$ se tiene que el incremento de temperatura es $\Delta T_{c,SiO_2}^{max} \simeq 3 \times 10^{-6}$ °C, mientras que para la plata en donde $\alpha_{Ag} = 1 \times 10^6\ m^{-1}$(a 830 nm) y $\kappa_{Ag} = 429$ W/m°K se tiene que $\Delta T_{c,Ag}^{max} \simeq 10$ °C.

Por otro lado, para láseres pulsados, la ecuación de transporte de calor (33) se reduce a

$$\mathcal{C}_v \frac{\partial T}{\partial t} = \alpha I(r); \tag{36}$$

se omite el término $-\kappa\nabla^2 T$ ya que en un tiempo $\tau_p << t_r$, una fracción insignificante de la energía absorbida puede difundirse fuera de la región de interacción. Aproximando $\partial T/\partial t$ como $\Delta T_p^{max}/\tau_p$, se llega a que la ecuación del incremento máximo de temperatura es de la forma (Boyd, 2008)

$$\Delta T_p^{max} = \frac{\alpha I^{max} \tau_p}{\mathcal{C}_v}. \tag{37}$$

Considerando el régimen pulsado y nuevamente a la sílice y a la plata (con $\mathcal{C}_{v,SiO_2} = 1.67 \times 10^6$ J/m^3°K y $\mathcal{C}_{v,Ag} = 9.18 \times 10^3$ J/m^3°K), pulsos de $\tau_p = 100$ fs, una potencia promedio de 150 mW y el mismo radio de haz que en el caso anterior, se tiene que $\Delta T_{p,SiO_2}^{max} \simeq 7.7 \times 10^{-14}$ °C y $\Delta T_{p,Ag}^{max} \simeq 0.01$ °C.

De las estimaciones anteriores se puede ver que para la sílice el incremento de la temperatura, bajo las condiciones de radiación láser tomadas en cuenta, es prácticamente despreciable tanto en el régimen de emisión continua como para el pulsado. Mientras que para

la plata el incremento de temperatura es más evidente que el caso de la sílice, pero sin ser aparentemente significativo para inducir daño alguno.

Sin embargo, cuando se tienen láseres pulsados hay que tomar en cuenta el tiempo entre pulso y pulso, y el tiempo de disipación de los cambios en la temperatura inducidos. Si este último es mayor o igual al periodo temporal de los pulsos, entonces existe la posibilidad de tener efectos de acumulación de temperatura. En un compuesto sílice-plata el tiempo de disipación puede estimarse en primera aproximación generalizando la ecuación (34) de la forma

$$t_r \approx \left[\frac{\mathcal{C}_{v,SiO_2} + \mathcal{C}_{v,Ag}}{\kappa_{SiO_2} + \kappa_{Ag}}\right] R^2 \approx \left[\frac{\mathcal{C}_{v,SiO_2}}{\kappa_{Ag}}\right] R^2, \tag{38}$$

considerando $\mathcal{C}_{v,SiO_2} = 1.67 \times 10^6$ J/m^3°K, $\kappa_{Ag} = 429$ W/m°K y $R = 2\ \mu m$ se tiene que $t_r \approx 16$ ns. Para un láser que emite pulsos ultracortos a una frecuencia de repetición de alrededor de 100 MHz (que es nuestro caso), se tiene que el tiempo entre pulso y pulso es de 10 ns. Asimismo, aunado al tiempo t_r de la ecuación (38), la interacción del pulso con el medio genera una onda de choque con duración $t_s = R/\upsilon_s$ (Fernández-Hernández *et al.*, 2012) (con R y υ_s el radio del haz de excitación y la velocidad del sonido en el medio, respectivamente), la cual puede contribuir al calentamiento. Para la sílice $\upsilon_s = 5970$ m/s, considerando $R = 2\ \mu m$ se tiene que $t_s = 33$ ns; el cual, al igual que t_r, es mayor que el tiempo entre pulso y pulso del láser (10 ns), pudiendo contribuir al calentamiento. Por lo tanto, es de esperarse una cierta acumulación de temperatura en la zona de irradiación.

En la segunda fase de este trabajo de tesis se utiliza una muestra de NPs-Ag elongadas incrustadas en una matriz de sílice, en la cual se escriben patrones en forma de guía de onda utilizando un láser pulsado de Ti:zafiro que emite pulsos de 88 fs centrados en 830 nm y con una taza de repetición de 94 MHz. En este sentido, como ya hemos visto en este

capítulo, por un lado, las muestras presentan efectos de GSA y, por otro lado, tienen una determinada absorción plasmónica. Además, también es factible que se tenga una cierta acumulación de temperatura debida a la alta tasa de repetición de los pulsos. Por lo tanto, no sería sorprendente que tanto efectos de origen multifotónico como térmicos pudiesen estar involucrados de alguna manera para causar daño en las NPs en la zona de la muestra irradiada como se demuestra en el capítulo 4.

2.6 Descripción del sistema de microscopía óptica de barrido

El diseño de un microscopio óptico de barrido láser está constituido básicamente por tres sistemas: el sistema de iluminación, el sistema de barrido óptico y el sistema de detección. Para su implementación algunos grupos han optado por utilizar sistemas comerciales confocales de barrido láser para implementar microscopía no-lineal, donde simplemente reemplazan el láser de luz continua por un láser de pulsos ultracortos así como algunos elementos ópticos (Diaspro, 2001; Girking, 2003; Manoj *et al.*, 2009). En contraste, otros grupos han utilizado microscopios ópticos invertidos para implementar las diversas técnicas de microscopía no-lineal (Ridsdale *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2003), o bien, optan por construir todo el sistema con el fin de poder utilizar la instrumentación para otros fines. Estos sistemas han sido descritos previamente por (Diaspro *et al.*, 2005; Fuentes, 2013) y a continuación se presenta una breve descripción de cada uno de ellos.

Sistema de iluminación: Consiste fundamentalmente de un láser de pulsos ultracortos (con duraciones de los pulsos en el orde de pico- a femto-segundos) cuyo campo eléctrico es suficientemente intenso para excitar de manera eficiente las propiedades no-lineales de la muestra. El láser se enfoca en una región muy pequeña en la muestra concentrando una gran cantidad de energía por unidad de área; logrando así intensidades del orden de

TeraWatts/μm^2, lo cual da origen a los procesos ópticos no-lineales.

Sistema de barrido óptico: Dado que el láser es enfocado fuertemente sólo se ilumina una zona pequeña de la muestra, esto es, se tiene una excitación puntual. Para generar una imagen se necesita un sistema de barrido óptico el cual puede ser de dos tipos: aquel en el que el haz láser se desplace por la muestra ("beam scanning"), o bien, en la que la muestra sea la que se desplace, mientras el haz permanece inmóvil ("stage scanning"). El primer método es el que se utiliza comúnmente y tiene la ventaja de una mayor velocidad de barrido y, por tanto, de una rápida formación de la imagen (Buist *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1999), además el espécimen no necesita ser movido durante el muestreo por lo que no necesita ser fijado, lo que lo hace especialmente interesante para el estudio de sistemas biológicos dinámicos.

Sistema de detección: Se caracteriza por tener detectores con mucha sensibilidad para detectar las señales diminutas generadas con la microscopía no lineal. Asimismo, se utilizan filtros ópticos o monocromadores con el fin de separar la señal de la luz del láser de excitación cuya potencia es varios órdenes de magnitud mayor a la de la señal esperada.

Los tubos fotomultiplicadores (PMT, por sus siglas en inglés) son los dispositivos de uso común para este propósito. Estos dispositivos convierten la energía de la luz incidente en fotoelectrones emitidos al vacío, los cuales son multiplicados en un proceso de emisión secundaria, a través de un arreglo de dínodos sujetos a un alto voltaje. Tienen una alta sensibilidad, un bajo ruido y puede ajustarse un valor de ganancia y un valor "offset" para cada detector. Un caso que sucede comúnmente es que la señal del haz de excitación (o del medio ambiente) sea detectada sumándose a la señal no lineal, siendo esto causa de una mala interpretación en los resultados. Para evitar esto generalmente se utilizan filtros interferométricos (pasa banda o dicróicos) cuyas densidades ópticas de rechazo pueden ser de dos hasta siete ordenes de magnitud.

Además de los PMTs, también se pueden utilizar otro tipo de detectores tales como los fotodiodos de avalancha. Estos son una buena opción en términos de sensitividad y de eficiencia cuántica, la cual es cercana al 80 % en el rango espectral visible. Sin embargo, dado que el área de fotosensibilidad es pequeña, se pueden presentar ciertos inconvenientes en el esquema de detección, además de que son costosos. Por otra parte, también se pueden utilizar cámaras CCD con una alta sensitividad y buena eficiencia cuántica, especialmente para la visualización de muestras a velocidad de video. De hecho, los resultados experimentales de la primera fase de este trabajo de tesis (que se presentan en el capítulo 3) se obtuvieron utilizando una cámara CCD.

Capítulo 3

Microscopía no-lineal de TPEF basada en una hoja de luz láser digital escaneada

En este capítulo se muestra una técnica innovadora de microscopía no-lineal de fluorescencia por excitación de dos fotones basada en una "excitación plana" la cual se crea mediante una hoja de luz láser digitalmente escaneada y que ha sido denotada como DLSM por sus siglas en inglés ("Digital Laser Light Sheet Microscopy"). Asimismo, se presentan los antecedentes a este trabajo, seguido de la implementación del arreglo experimental diseñado para trabajar con cuatro modalidades del DLSM: 1) régimen lineal con haces Gaussianos (DSLM-Gauss); 2) régimen no-lineal con haces Gaussianos (2p-DSLM-Gauss); 3) régimen lineal con haces Bessel (DSLM-Bessel) y 4) régimen no-lineal con haces Bessel (2p-DSLM-Bessel). Se presenta la caracterización del sistema y los resultados obtenidos con muestras vivas de *Caernohabditis elegans* (*C. elegans*), realizando una comparación entre cada una de las modalidades disponibles y mostrando las ventajas de cada una de éstas.

3.1 Antecedentes

Tal y como se mencionó en el capítulo 1, las técnicas de microscopía multifotónica requieren de un sistema de barrido láser para escanear la muestra, la señal obtenida durante el barrido se colecta y se envía hacia el sistema de detección para generar una imagen del área escaneada por el haz enfocado. Estas técnicas ofrecen la posibilidad de obtener "secciones ópticas" intrínsecas de la muestra, lo que permite obtener imágenes tridimensionales de la misma. Sin embargo, en estas técnicas de barrido láser el campo de visión es reducido, limitando así el estudio de muestras relativamente grandes (en el orden de milímetros). Un aspecto

importante que debe considerarse, principalmente cuando se utilizan muestras biológicas, es el fotodaño inducido causado por las largas exposiciones de la muestra hacia la luz de excitación, así como por la longitud de onda e intensidad de la misma. Además, la excitación y colección se dan a lo largo del mismo eje, por lo tanto, la muestra es irradiada completa y repetidamente cuando se toman imágenes a diferentes planos y como consecuencia también se tiene una acumulación del fotodaño (Pawley, 2006).

Huisken et al., (Huisken *et al.*, 2004) demostró que el problema de fotoblanqueo disminuye considerablemente utilizando la microscopía de iluminación de plano selectivo (SPIM, por sus siglas en inglés). En SPIM, la excitación producida en el plano de la muestra es una hoja de luz estática y es formada por una lente cilíndrica. La luz de fluorescencia emergente de este plano es colectada a 90 grados con respecto a la excitación utilizando un objetivo de microscopio. De aquí que la técnica de SPIM tiene ciertas ventajas tales como: a) la adquisición "instantánea" de imágenes en 2D con un mayor campo de visión, sin la necesidad de hacer un barrido del haz en dicho plano y b) el desacoplamiento de las resoluciones espaciales transversal y axial, determinadas por la apertura numérica (AN) del objetivo de colección y el grosor de la hoja de luz, respectivamente (Greger *et al.*, 2007). Otro beneficio de esta técnica es la reducción del fotodaño a la muestra debido a la restricción de la irradiación en el plano bajo observación (Reynaud *et al.*, 2008). La rápida adquisición de las imágenes obtenidas con SPIM la hacen una herramienta poderosa para estudios *in vivo* de células, organismos y tejidos (Huisken y Stainier, 2009). Sin embargo, la técnica de SPIM tiene los mismos inconvenientes de la microscopía confocal. Por un lado, para la excitación se utilizan láseres de emisión continua con longitudes de onda cercanas al ultravioleta, provocando que haya un mayor esparcimiento (en tejido por ejemplo); limitando así la adquisición de imágenes a una reducida profundidad de penetración. Por otro lado, la hoja de luz generada

carece de homogeneidad debido a la lente cilíndrica, además para tener un campo de visión grande es necesario incrementar la profundidad de campo de dicha lente, lo cual se logra utilizando lentes de baja apertura numérica. Sin embargo, esto también reduce la capacidad de seccionado óptico.

Una variante de la técnica de SPIM es aquella en la cual la excitación es mediante un proceso de absorción de dos fotones (2p-SPIM), Palero et al., (Palero *et al.*, 2010) la utilizó recientemente para adquirir imágenes de la faringe de *C. elegans* que expresa la proteína fluorescente cameleon. La mejora de esta técnia, respecto a la de SPIM, radica precisamente en el uso de la fuente de excitación pulsada en el infrarrojo (láser de Ti:zafiro) lográndose así un menor esparcimiento en la muestra y por lo tanto una mayor profundidad de penetración en la misma. Sin embargo, comparada con la TPEF de barrido láser, en 2p-SPIM la intensidad total de la excitación no-lineal es reducida debido a que es distribuida sobre el plano de la hoja de luz. Esto reduce considerablemente la eficiencia de la fluorescencia generada.

Otra variante interesante de la implementación de SPIM es la microscopía de una hoja de luz (láser) digital escaneada (DSLM, por sus siglas en inglés) que consiste en la generación de una hoja de luz basada en el escaneo en una dirección de un haz Gaussiano enfocado (Keller *et al.*, 2008). Las ventajas de DSLM, con respecto a SPIM y 2p-SPIM, son dos: a) la potencia de la luz de excitación se concentra solamente en la línea de luz que forma la hoja proporcionando una mejor eficiencia de iluminación y tiempos de exposición más bajos, y b) la hoja de luz generada es más homogénea en intensidad y su ancho puede ser fácilmente controlado variando la amplitud del barrido

Recientemente, Truong (Truong *et al.*, 2011) reportaron el uso de DSLM utilizando excitación de dos fotones (2p-DSLM) en embriones de pez cebra y de mosca de fruta. En ese trabajo se muestran las ventajas de usar 2p-DSLM sobre 1p-DSLM y microscopía de TPEF

de barrido láser. Como es de esperarse, dichas ventajas radican en el uso de excitación láser pulsada en el infrarrojo y en la homogeneidad de la hoja de luz generada, lo cual resulta finalmente en la adquisición de imágenes de organismos vivos con mayor profundidad, de una manera más rápida y con menos efectos de fotodaño.

Por otro lado, se ha demostrado que el uso de haces Bessel permiten adquirir imágenes en un campo mayor de visión y con una mayor profundidad en comparación con los haces Gaussianos (Fahrbach *et al.*, 2010), pero hasta ahora no se han utilizado haces Bessel combinados con 2p-DSLM. Una de las ventajas de los haces Bessel, respecto a los haces Gaussianos, es que éstos son adifraccionales, es decir, preserva su perfil transversal espacial sin difractarse en distancias mayores de propagación. De hecho, se ha demostrado que con los haces Bessel (comparado con los haces Gaussianos) se logran obtener imágenes con un 50 % más de profundidad en piel humana (Fahrbach *et al.*, 2010; Planchon *et al.*, 2011). Una manera de generar un haz Bessel (a partir de un haz Gaussiano) es mediante un axicón, el cual es un elemento óptico circular cónico refractivo que desvía la luz a un ángulo constante respecto al eje del elemento. La luz desviada no se enfoca en un solo punto, sino que lo hace a lo largo de una línea sobre el eje óptico (ver figura 10).

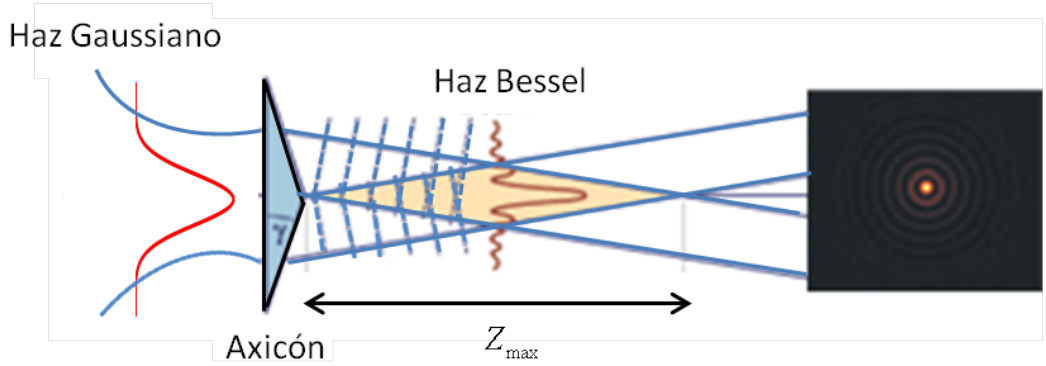

Figura 10. Diagrama de la generación de un haz Bessel a partir de un haz Gaussiano utilizando un axicón. El haz Bessel se puede formar en la distancia de propagación Z_{max}.

El trabajo que se presenta en este capítulo se basa en mostrar cómo es que 2p-DSLM combinado con haces Bessel (2p-DSLM-Bessel) mejoran el seccionado óptico, la resolución espacial y la uniformidad de la intensidad en la hoja de luz. Logrando un mayor campo de visión y permitiendo así estudiar muestras más grandes. Esta modalidad es comparada directamente con el caso lineal (DSLM-Bessel) y con haces Gaussianos en ambos regímenes: lineal (DSLM-Gauss) y no-lineal (2p-DSLM-Gauss). Asimismo, se presenta la caracterización completa del sistema y los resultados obtenidos en muestras vivas de *C. elegans* utilizando las cuatro modalidades disponibles.

3.2 Arreglo experimental

El esquema del arreglo experimental se muestra en la figura 11. El sistema puede ser configurado para trabajar en una de las siguientes cuatro modalidades: i) DSLM lineal con haces Gaussianos (DSLM-Gauss), ii) DSLM no-lineal con haces Gaussianos (2p-DSLM-Gauss), iii) DSLM lineal con haces Bessel (DSLM-Bessel) y iv) DSLM no-lineal con haces Bessel (2p-DSLM-Bessel).

Sistema de excitación

La fuente de excitación es un oscilador láser de modos amarrados ("mode-locking") de Titanio-zafiro (MIRA 900f, Coherent, France) bombeado por un láser de estado sólido de CW (Verdi, Coherent). El oscilador láser emite pulsos con una duración de 160 fs, centrados en 860 nm y a una frecuencia de repetición de 76 MHz. La potencia promedio del láser alcanza 600 mW como máximo. El haz láser a la salida del oscilador es colimado y expandido mediante un sistema telescópico de tal manera que cubre completamente el área de los espejos galvanométricos.

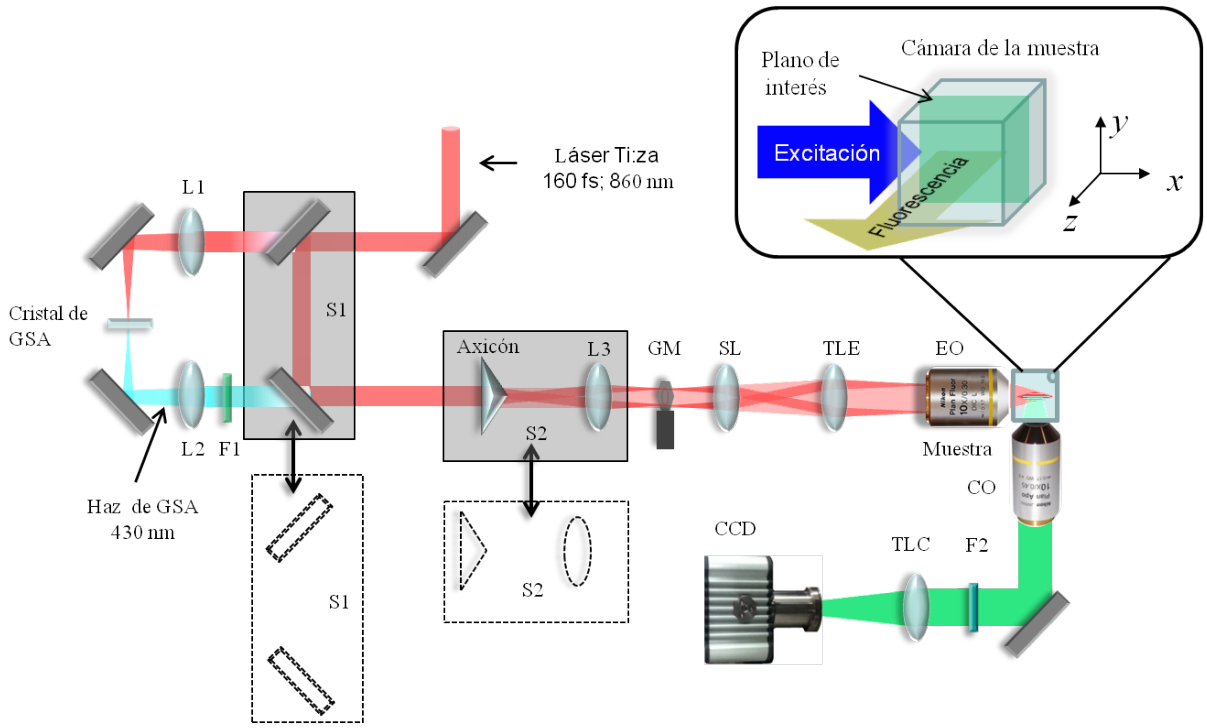

Figura 11. Diagrama esquemático del arreglo experimental del sistema DLSM implementado. La base de traslación S1 permite cambiar entre el régimen lineal (el haz del láser pasa a través del cristal de SHG y las lentes L1 y L2) y el no-lineal (el haz láser pasa directamente). Los haces Gaussianos o Bessel son seleccionados moviendo la base de traslación S2 que contiene el axicón y la lente L3. El espejo galvanométrico (GM), la lente escaneadora (SL), la lente de tubo (TL) y el objetivo de excitación (EO) son usados para crear la hoja de luz en el plano de la muestra. La señal de fluorescencia generada en la muestra es colectada a 90° por el objetivo de colección (CO) y una lente de tubo (TLC) que forma la imagen en la cámara CCD. El filtro F2 es utilizado para bloquear la luz de excitación y transmitir la luz de la fluorescencia generada. El esquema del recuadro colocado en la parte superior derecha muestra la geometría de la excitación y colección que define la notación de los ejes utilizados en este trabajo.

Para la modalidad de excitación lineal con haces Gaussianos (DSLM-Gauss), la base de traslación S1 se desplaza hacia afuera de la trayectoria, permitiendo pasar el haz a través de la lente L1 (de distancia focal $f_{L1} = 95$ mm) enfocándolo en un cristal de beta-borato de bario (BBO, cortado a 29.2° @ 800 nm) para doblar la frecuencia del láser mediante la generación de segundo armónico. Posteriormente, la lente L2 de distancia focal $f_{L2} = 125$ mm colima la luz y el filtro F1 (BG-39) transmite la luz de 430 nm emergente del cristal BBO. Después del sistema de espejos galvanométrico GM (GVS002,Thorlabs), se coloca un sistema

telescópico compuesto por dos lentes acromáticas de 25.4 mm de diámetro, con distancias focales $f_{SL} = 35$ mm y $f_{TLE} = 125$ mm, respectivamente. Este sistema telescópico es tal que los planos del sistema GM y de la apertura de entrada del objetivo de excitación EO (10×, AN=0.3, WD=16 mm, Nikon, Japan) son conjugados. Esto garantiza pivotear el haz en esta posición manteniéndolo inamovible durante el escaneo del haz y conservando así constante la intensidad que entra al objetivo. Además, amplifica el tamaño del haz entrante, esto con la finalidad de aprovechar la mayor resolución espacial dada por el objetivo.

Para la modalidad de excitación no-lineal con haces Gaussianos (2p-DSLM-Gauss), el haz del láser Ti:zafiro se envía directamente hacia el sistema de escaneo y el objetivo de excitación. En este caso, la base de traslación S1 que contiene un par de espejos se inserta en la trayectoria del haz. Por otro lado, para el caso de excitación lineal con haces Bessel (DSLM-Bessel), la base de traslación S1 se desplaza hacia afuera de la trayectoria óptica y se inserta la base de traslación S2, en la cual está montado un axicón (vidrio UVFS, ángulo de ápice de 176°) y una lente acromática L3 de distancia focal $f_{L3} = 75$ mm, la distancia entre la lente L3 y el sistema GM es de 75 mm. Esta última configuración es tal que la imagen del haz Bessel es formada en el sistema GM y, debido a la configuración del sistema telescópico formado por SL y TLE, el haz Bessel es formado en el plano de la muestra por el objetivo EO. Para eliminar la interferencia de las componentes de frecuencias espaciales bajas generadas por el defecto de punta redonda del axicón, se utiliza una obstrucción circular opaca colocada en la apertura de entrada del objetivo EO (Brzobohatý *et al.*, 2008).

Para la modalidad de excitación no-lineal utilizando haces Bessel (2p-DSLM-Bessel), las bases de traslación S1 y S2 se insertan en la trayectoria óptica para enviar el haz Bessel hacia el sistema de escaneo y el objetivo de excitación.

Finalmente, es importante mencionar que con la finalidad de ajustar el tamaño del haz

de excitación Gaussiano al dado por el primer anillo del haz Bessel, la apertura numérica efectiva del objetivo EO es reducida a la mitad de su valor, es decir, AN=0.15. Esto se logra mediante un diafragma, el cual es colocado justo antes de la apertura de entrada del objetivo EO.

Sistema de detección

En el recuadro superior derecho de la figura 11 se muestra el esquema del proceso de excitación y colección de la señal de fluorescencia. El plano xy define el plano de interés; mismo que es el plano imagen del objetivo de colección. El eje z representa la dirección donde la señal de fluorescencia es colectada. Por lo tanto, en nuestro sistema DSLM, el haz de excitación se propaga a lo largo del eje x y la hoja de luz es generada en el plano xy de la muestra escaneando el haz en la dirección y mediante el sistema GM.

El espécimen bajo observación es montado en una base con seis grados de libertad que permite hacer ajustes finos de posición e inclinación con respecto a la hoja de excitación. La base es montada sobre una platina traslacional micrométrica (M-505.6DG, Physik Instrumente GmbH Co. KG, Karlsruhe, Germany) controlada por computadora, la cual mueve la muestra a lo largo de la dirección z en pasos submicrométricos.

La señal de fluorescencia es colectada por el objetivo de colección CO (10×, AN=0.45, WD=4 mm) que es colocado, con su eje ortogonal al plano de la muestra, a lo largo de la dirección z. El filtro pasa banda F2 (CFP: 479/40) es utilizado para bloquear la luz de excitación y transmitir solamente la señal de fluorescencia. La lente de tubo TLC de distancia focal $f_{TLC} = 200$ mm forma la imagen de fluorescencia en la cámara CCD (Orca R2, tamaño de píxel de 6.45 μm, 1344 x 1024 píxeles, Hamamatsu). La sincronización de la adquisición de imágenes con el movimiento micrométrico (a lo largo de la dirección z) dado por la platina

traslacional micrométrica fue realizada mediante un programa desarrollado en LabView. En este programa se pueden controlar los parámetros de la cámara CCD (ganancia y tiempo de integración) y de la platina traslacional (tamaño de paso y tiempo de espera entre pasos).

3.3 Grabado y procesamiento de imágenes

La toma de imágenes de fluorescencia se realiza con la cámara CCD mediante una interface desarrollada en LabView. Los parámetros de adquisición de las imágenes, tales como la ganancia, tiempo de integración y tamaño de paso, fueron variados en algunos casos. Estos parámetros se reportan en la sección de resultados para las diferentes modalidades disponibles del sistema DSLM. Las imágenes obtenidas se graban directamente como archivos ".jpg" y se procesan posteriormente para su análisis. El procesamiento y análisis de las imágenes se realiza utilizando el programa ImageJ; un software del dominio público creado por Wayne Rasband del "National Institute of Health", Estados Unidos. Con este software se pueden procesar imágenes tomadas estáticamente, en movimiento y en tres dimensiones (3D). La figura 12 esquematiza el procedimiento de la obtención de imágenes a diferentes planos de la muestra. Después, mediante las herramientas del ImageJ, es posible realizar reconstrucciones tridimensionales de la muestra en observación.

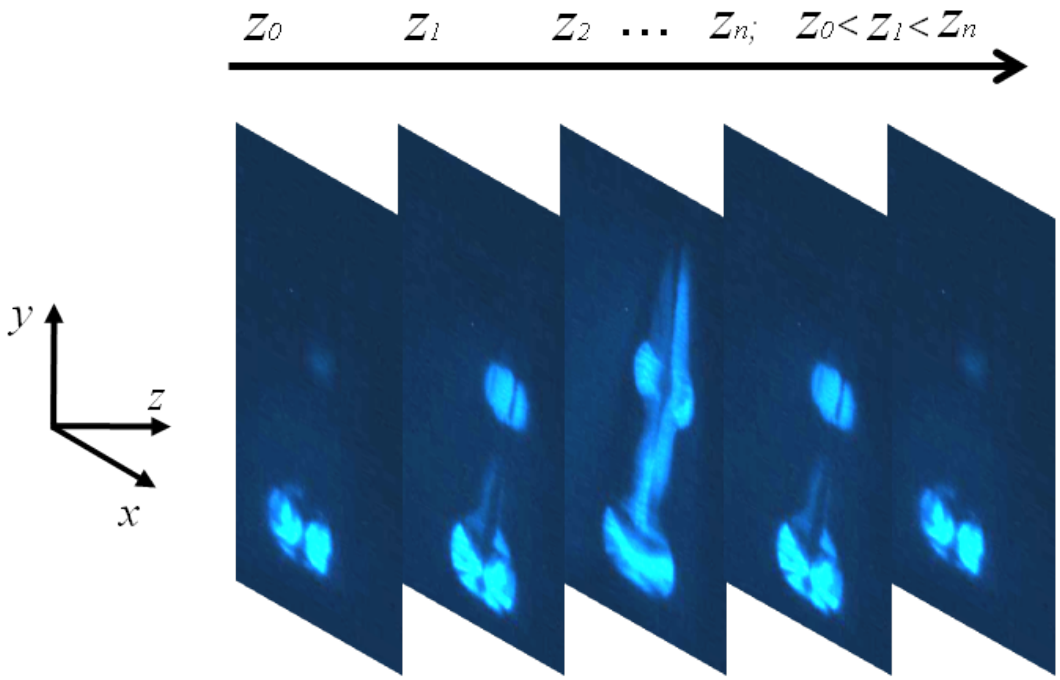

Figura 12. Esquema de la obtención de imágenes de la faringe de un *C. elegans* a diferentes planos. Posteriormente las imágenes pueden ser procesadas para realizar una visualización tridimensional de la muestra en estudio.

3.4 Preparación de las muestras

3.4.1 Cumarina y microesferas fluorescentes

Para la caracterización del sistema se utilizaron dos muestras diferentes. La primera de ellas consistió en una cubeta de cuarzo que contenía una solución de cumarina 540 (pigmento orgánico fluorescente) disuelta en metanol a una concentración de 0.5 mmol/L, esta muestra se utilizó para caracterizar las dimensiones de las líneas de luz (haces enfocados sin escanear) generadas en el plano de la muestra. La hoja de luz es generada al escanear rápidamente la línea de luz en la dirección y (ver figura 11). La segunda consistió en una muestra de agar sólido con microesferas fluorescentes verdes de 0.5 μm de diámetro ($G500$, solution 1% solids Duke Scientific Corp., USA). Para esta última, se creó una solución de 1 : 10 de microesferas-

agua y después se mezcló con 2% de agar derretido en una concentración 1 : 100. Se depositó una gota de 200 μl de la solución final de microesferas-agar en un cubreobjetos y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez solidificado el agar, se realizó un corte de una esquina a 90°. El cubreobjetos que contenía el corte de agar fue montado en la base con una de sus caras apuntando hacia el objetivo de excitación y la otra hacia el objetivo de colección.

3.4.2 Muestras biológicas

Para poner a prueba el sistema para aplicaciones biológicas, se utilizaron muestras de *C. elegans*. Los *C. elegans* son una especie de nemátodos que han sido tomados como organismos modelos para realizar estudios en diversas áreas tales como la biología celular y neurociencias, por mencionar algunas. Su ciclo de vida en condiciones óptimas es de alrededor de tres días y no requieren de condiciones especiales para mantenerse, por lo cual se pueden tener sin problema en el laboratorio solamente con la alimentación y el medio de cultivo apropiados. Estos nemátodos se autofecundan y las nuevas generaciones adoptan las mismas características genéticas que las procreadoras. Además, su anatomía es bastante completa, por ejemplo, tienen un sistema nervioso, múscular y una faringe, por mencionar algunos. Los gusanos adultos llegan a medir alrededor de 1.10 mm de longitud. En la figura 13, se muestra una imágen esquemática de la estructura anatómica de un *C. elegans*. Para nuestros experimentos se prepararon muestras de uno o varios *C. elegans* adultos, los cuales fueron inmovilizados utilizando 5 μl de azida sódica (NaN_3, 25 mM) y se dejaron en reposo por 10 minutos. Los gusanos fueron escogidos y montados en la parte superior de una plataforma de agar (al 2%) de $5mm$ de grosor, esto con la finalidad de mantenerlos apropiadamente hidratados. Esta configuración, al igual que en el caso de las microesfereas fluorescentes, permite

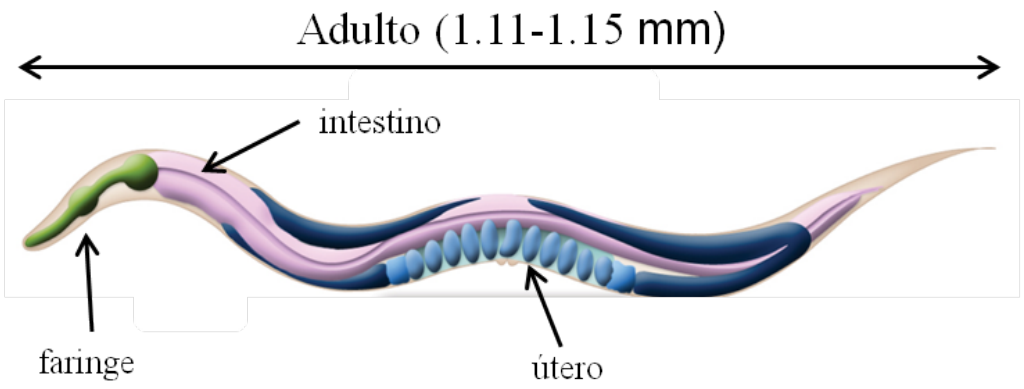

Figura 13. Esquema de la estructura anatómica de un *C. elegans* adulto.

utilizar objetivos de microscopio en aire. Los *C. elegans* utilizados expresan la proteína fluorescente "cameleon" en la faringe. Esta proteína es usada normalmente como un indicador de calcio y se ha utilizado para monitorear el movimiento y níveles de calcio en *C. elegans* intactos (Kerr *et al.*, 2000). Dicha proteína está compuesta de cuatro dominios: la proteína fluorescente cyan (CFP, por sus siglas en inglés); calmodulina; M13 (un dominio de unión de la calmodulina) y la proteína fluorescente amarilla (YFP, por sus siglas en inglés). En este experimento, se excitó solamente la proteína CFP para visualizar la faringe completa.

3.5 Resultados

3.5.1 Caracterización del sistema

Los experimentos realizados para la caracterización del sistema DSLM tuvieron como finalidad medir las dimensiones de las líneas de luz de fluorescencia generadas y determinar las resoluciones espaciales transversal y axial de la función de punto extendido (PSF, por sus siglas en inglés) de cada una de las modalidades disponibles. En este trabajo, las mediciones se hicieron considerando el criterio del ancho completo a la mitad del máximo (FWHM, por

sus siglas en inglés) de los diferentes perfiles y distribuciones de intensidad normalizados.

El primer conjunto de experimentos fue realizado usando la solución de cumarina descrita en la sección 3.4.1. En este caso, el sistema GM se mantuvo estático y la línea de fluorescencia generada en la muestra fue capturada por la cámara CCD. Las imágenes de las líneas de excitación y los perfiles de intensidad a lo largo de los ejes x y y se presentan en la figura 14 para cada una de las modalidades: a-c) DSLM-Gauss; d-f) 2p-DSLM-Gauss; g-i) DSLM-Bessel y j-l) 2p-DSLM-Bessel. Los anchos (FWHM) Δx y Δy de los perfiles se muestran en cada gráfica y son resumidos más adelante en la tabla 1.

De la figura 14 es posible ver que cuando se usan haces Gaussianos en el régimen no-lineal (2p-DSLM-Gauss), el campo de visión se reduce considerablemente (menor al 25% comparado con el régimen lineal DSLM-Gauss). No obstante, para el caso lineal (DSLM-Gauss) una cantidad considerable de señal de fondo es apreciada fuera del rango de Rayleigh del haz (ver figura 14a). Por otro lado, las modalidades que usan haces Bessel muestran un aumento en el campo de visión, lo cual es evidente ya que hay un incremento de la línea de luz a lo largo de la dirección x (ver figuras 14h y 14k). Nótese que los anchos Δy de las líneas de luz muestran pequeñas variaciones en todas las modalidades, excepto para el caso DSLM-Bessel donde el ancho es más del doble que para los casos de haces Gaussianos (ver figura 14i). Además, la figura 14g muestra que para este caso (DSLM-Bessel), el difuminado ("blurring") en los extremos del campo de visión efectivo aumenta considerablemente, caso contrario a lo que sucede en las modalidades que utilizan excitación no-lineal, en donde el difuminado desaparece (ve figuras 14d y 14j). También, es importante notar que en los casos que se utilizan haces Bessel, el perfil de intensidad a lo largo de la dirección x es asimétrico y puede ser apreciado en las figuras 14h y 14k. Este efecto ha sido observado anteriormente en axicones reales en donde se aprecia que la razón de decaimiento es más lenta para los puntos

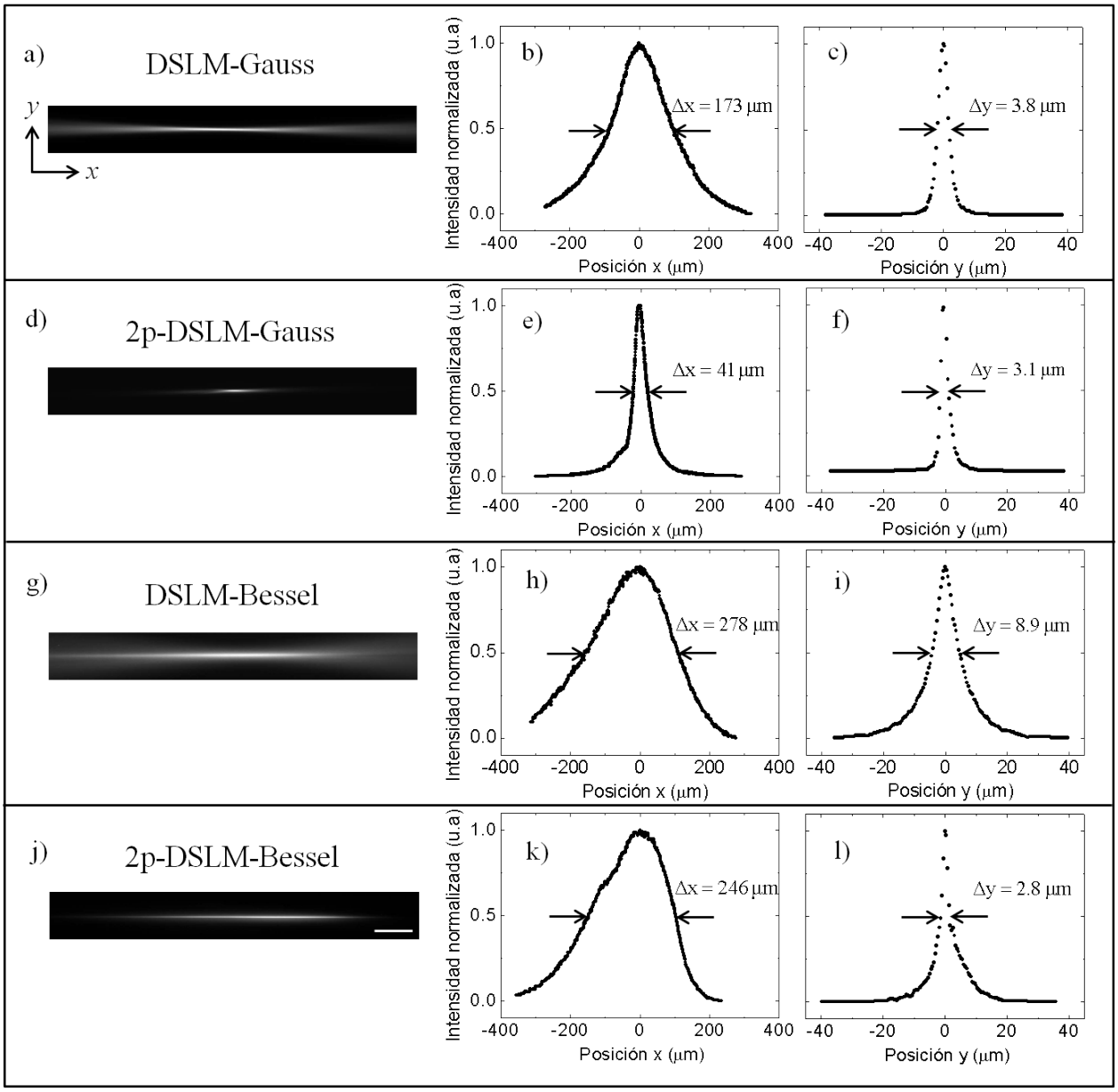

Figura 14. Imágenes de fluorescencia normalizadas y perfiles de intensidad a lo largo de la dirección x y y para las diferentes modalidades: a-c) DSLM con haces Gaussianos; d-f) 2p-DSLM con haces Gaussianos; g-i) DSLM con haces Bessel y j-l) 2p-DSLM con haces Bessel. Los anchos FWHM son indicados con las flechas para cada modalidad, asimismo se muestran los valores correspondientes Δx y Δy. Estos valores también son resumidos en la tabla 1. Los perfiles fueron tomados a lo largo de las direcciones x y y con el punto de máxima intensidad localizado en el origen de las coordenadas. La barra de escala corresponde a 50 μm.

más alejados de la punta del axicón (Akturk *et al.*, 2008).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la hoja de luz se genera al escanear rápidamente la línea de fluorescencia en la dirección y. En la figura 15 se muestran las imágenes de la hoja de luz generada en la solución de cumarina para las modalidades DSLM-Gauss y 2p-DSLM-Gauss. En las figuras 15a y 15d el sistema GM estuvo estático (0 mV), las hojas de luz generadas aplicando un voltaje de 300 mV (a una frecuencia de 100 Hz) a uno de los espejos del sistema GM se muestran en las figuras 15b y 15e, mientras que las correspondientes a 600 mV se muestran en las figuras 15c y 15f. De aquí se puede notar que la amplitud de la hoja de luz puede ser fácilmente modificada simplemente variando el voltaje aplicado teniendo una

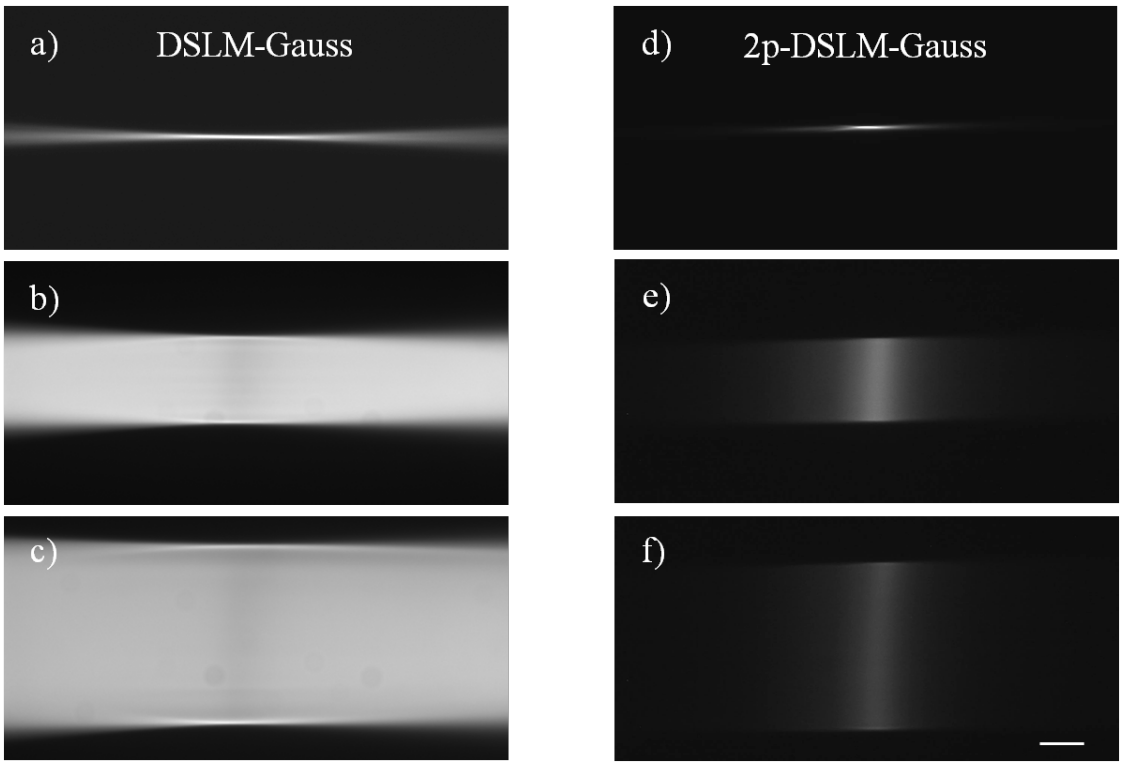

Figura 15. Imágenes de las hojas de luz generadas en una solución de cumarina a diferentes amplitudes. Para la modalidad DSLM-Gauss los voltajes aplicados al sistema GM fueron de a) 0 mV, b) 300 mV y c) 600 mV. Las imágenes en las figuras 3 d), 3 e) y 3 f) corresponden a la modalidad 2p-DSLM-Gauss para los voltajes aplicados al GM de 0 mV, 300 mV y 600 mV, respectivamente. La escala de barra representa 50 μm.

buena homogeneidad de la misma. Estas son algunas de las ventajas que ofrece la técnica de DSLM respecto a SPIM, ya que en esta última la amplitud de la hoja de luz generada por la lente cílindrica es fija y menos uniforme.

El segundo conjunto de experimentos se realizó para medir el tamaño de las funciones de punto extendido (PSFs), asociadas a las resoluciones transversal (δr) y axial (δz) de las cuatro modalidades del sistema DSLM. Para esto, se utilizó una muestra de microesferas fluorescentes inmersas en agar tal como se describió en la sección 3.4.1. Para cada modalidad, se grabó una secuencia de imágenes moviendo la muestra en pasos de 0.2 μm a lo largo de la dirección z y se capturó una imagen por cada paso, procedimiento descrito anteriormente en la sección 3.3.

En cada secuencia de imágenes, se seleccionaron alrededor de 30 microesferas en el centro del campo de visión, cada una de estas fue "recortada" para analizar por separado las distribuciones de intensidad a lo largo de los tres ejes de referencia. Los perfiles de intensidad fueron ajustados a una función Gaussiana y se calcularon los respectivos valores de los anchos al FWHM. En la figura 16 se muestran algunos ejemplos de dichos perfiles de intensidad con sus respectivos ajustes Gaussianos para el caso de una microesfera. Los recuadros de la parte superior izquierda muestran las imágenes de distribución de intensidad proyectadas en las direcciones transversal y axial.

En la tabla 1 se muestran los valores promedios obtenidos considerando 30 microesferas. Para obtener el ancho de la PSF transversal (δr), se usó el promedio de las mediciones en la dirección x y y, es decir, $\delta r = 0.5\ (\delta x + \delta y)$.

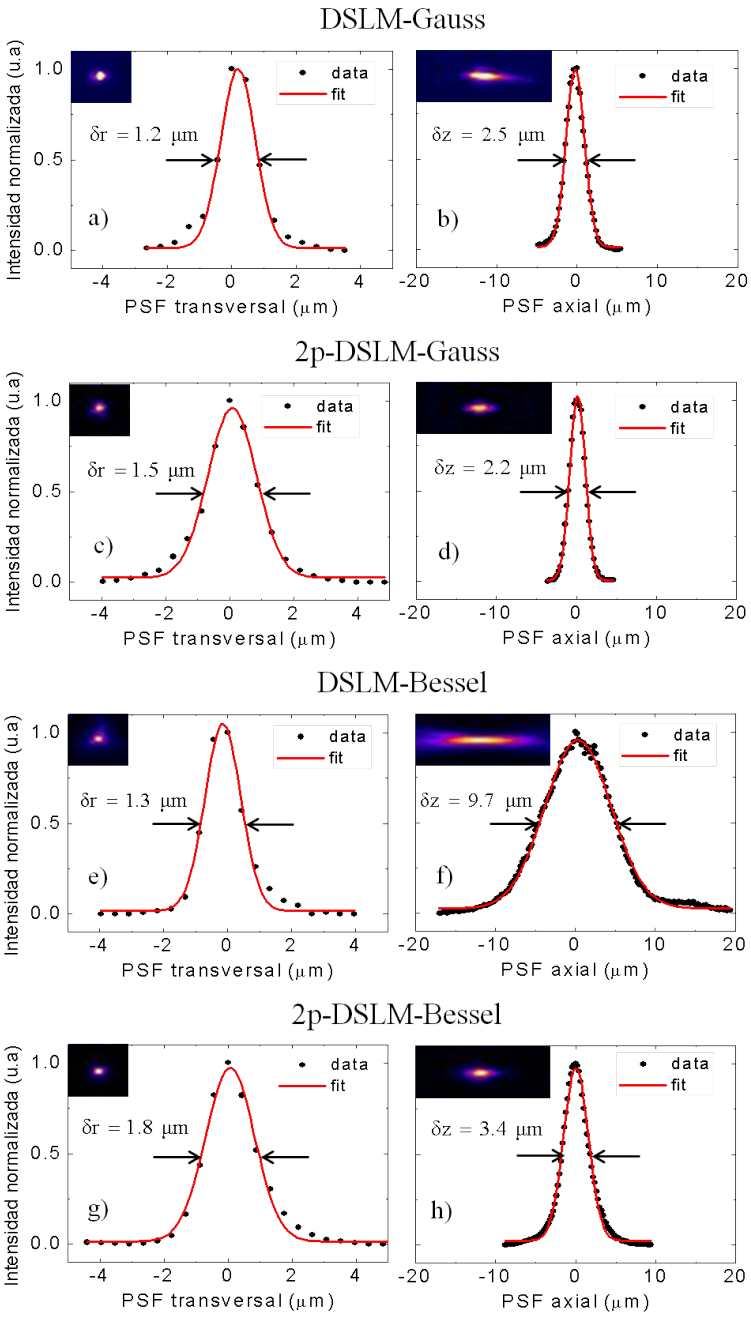

Figura 16. Ejemplo de las PSFs obtenidas para el sistema usando microesferas fluorescentes inmersas en agar. Se muestran los perfiles de intensidad experimentales (puntos negros) y los ajustes Gussianos (líneas rojas) para las dimensiones transversa (δr) y axial (δz) para las diferentes modalidades: a, b) DSLM con haces Gaussianos; c, d) 2p-DSLM con haces Gaussianos; e, f) DSLM con haces Bessel y g,h) 2p-DSLM con haces Bessel. Los anchos FWHM calculados considerando los ajustes Gaussianos y las imágenes de distribución de intensidad correspondientes son mostrados sobre cada gráfica.

Tabla 1. Sumario de los anchos medidos al FWHM para las líneas de luz (Figura 14) y para las PSFs del sistema (Figura 16). El valor promedio y el error estadístico en las PSFs fueron obtenidos sobre 30 mediciones.

Modalidad	Dimensiones de la línea de luz fluorescente		PSFs de las microesferas fluorescente	
	Δx (μm)	Δy (μm)	Δr (μm)	Δz (μm)
DSLM-Gauss	173	3.8	1.2 $\pm$0.2	2.6 $\pm$0.5
2p-DSLM-Gauss	41	3.1	1.5 $\pm$0.2	2.3 $\pm$0.1
DSLM-Bessel	278	8.9	1.3 $\pm$0.1	10.7 $\pm$0.9
2p-DSLM-Bessel	246	2.8	1.4 $\pm$0.2	3.2 $\pm$0.3

Se ha demostrado que la resolución transversal de un sistema SPIM depende exclusivamente de las propiedades ópticas del objetivo de colección, mientras que la resolución axial es determinada tanto por el objetivo de colección como por el ancho de la hoja de luz (Engelbrecht y Stelzer, 2006). Por lo tanto, es de esperarse una resolución transversal similar para todas las modalidades y diferentes resoluciones axiales dependiendo del ancho así como de la calidad de la hoja de luz. Esto es precisamente lo que se observa en la tabla 1, donde se puede ver que las PSFs transversales son muy similares. Sin embargo, este no es el caso para las PSFs axiales, las cuales resultaron ser diferentes para cada una de las modalidades y menores para los regímenes no-lineales. También, como era de esperarse, hay una clara correlación entre el ancho de la hoja de luz y la degradación de la resolución axial, esto se puede apreciar comparando las figuras 14c, 14f, 14i y 14l con las figuras 16b, 16d, 16f y 16h, o bien, directamente de la tabla 1 (columnas Δy y Δz). Todos los casos indican que en la adquisición de imágenes, se espera una mejor resolución axial para los regímenes no-lineales. Efectivamente, esto es demostrado con una serie de experimentos usando *C. elegans* cuyas faringes están marcadas con la proteína fluorescente cameleon. Los resultados obtenidos

utilizando los *C. elegans* se muestran en la siguiente sección.

3.5.2 Imágenes de *C. elegans*

Primeramente se adquirió la imagen de la faringe de un *C. elegans* que expresa la proteína fluorescente cameleon utilizando un sistema SPIM convencional, en donde la hoja de luz es formada mediante una lente cilíndrica. Cabe mencionar que este sistema SPIM (Greger *et al.*, 2007) ha sido utilizado en varias muestras biológicas tales como: tejido y organos de ratón, embriones de Drosophila y pez cebra, por mencionar algunos. Los resultados obtenidos con SPIM en *C. elegans* son usados en esta tesis solamente como una referencia para comparar las modalidades de nuestro sistema DSLM que utilizan haces Gaussianos (DSLM-Gauss y 2p-DSLM-Gauss). En la figura 17 se muestran los resultados de dicha comparación y los parámetros experimentales utilizados se enlistan en la tabla 2. En las figuras 17a-f se muestran la proyección de máxima intensidad y las secciones ópticas de la faringe del *C. elegans* obtenidas utilizando las técnicas de SPIM convencional, DSLM-Gauss y 2p-DSLM-Gauss, respectivamente. Comparando estas imágenes es posible ver que los resultados obtenidos con

Tabla 2. Sumario de los parámetros experimentales empleados en la Figura 17. El objetivo de microscopio marcado con † fue de inmersión en agua, el resto fueron para operar en aire.

Modalidad	Objetivos		Parámetros			
	Excitación	Colección	Longitud de onda (nm)	Potencia Promedio (mW)	Tiempo de Int. (ms)	Incremento en z (μm)
SPIM	$5x/0.12$	$10x/0.3^{\dagger}$	488	< 1	500	2
DSLM-Gauss	$5x/0.12$	$10x/0.3$	430	2	180	2
2p-DSLM-Gauss	$5x/0.12$	$10x/0.3$	860	58	220	2

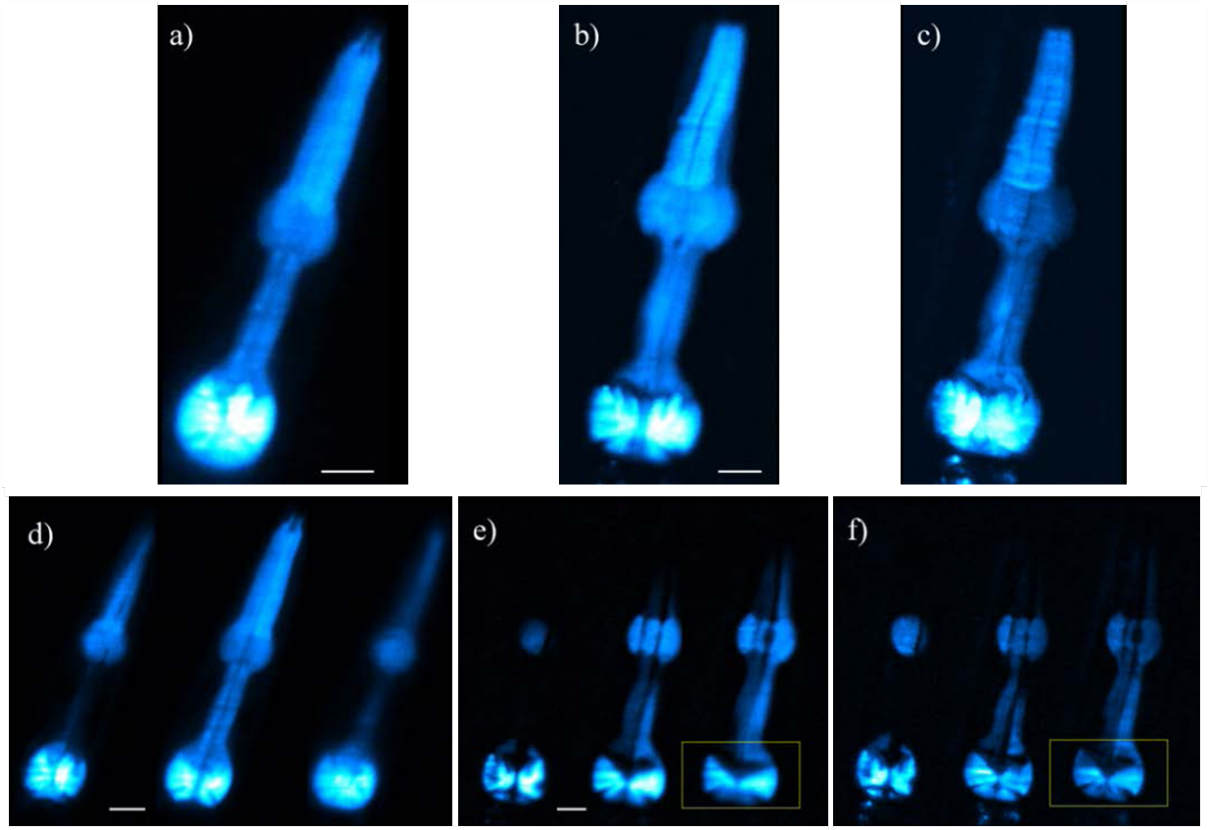

Figura 17. Imágenes de fluorescencia la faringe de un C. elegans. Las figuras a)-c) son imágenes de proyección de máxima intensidad tomadas con a) el sistema SPIM convencional, b) DSLM-Gauss y c) 2p-DSLM-Gauss. Las figuras d)-f) muestran imágenes de secciones ópticas individuales obtenidas con SPIM convencional, DSLM y 2p-DSLM-Gauss, respectivamente. Para hacer la reconstrucción tridimensional completa de la faringe fue necesario tomar 54 imágenes, cada una con un paso de 2 μm en la dirección z. La barra de escala representa 20 μm.

SPIM y DSLM son similares. Sin embargo, comparando directamente las figuras 17d-f, se aprecia que cuando se utiliza excitación no-lineal las imágenes de la faringe aparecen menos borrosas y se aprecian mejor algunos detalles.

Para cuantificar los resultados obtenidos con el sistema DSLM, se grafican dos perfiles de intensidad a lo largo de una línea en las estructuras fluorescentes. Esto se ha hecho en la misma faringe y en la misma sección óptica para ambas modalidades (DSLM-Gauss y 2p-DSLM-Gauss). En las figuras 18a y 18b se muestran las imágenes de las estructuras

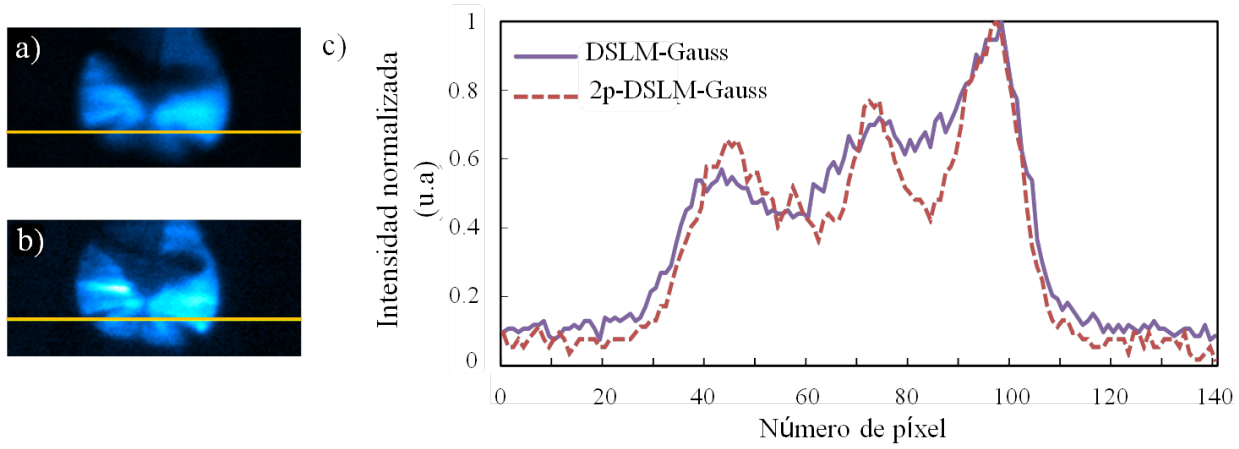

Figura 18. Ejemplo de la mejora del contraste obtenido con la modalidad 2p-DSLM-Gauss. Imágenes de fluorescencia tomadas de una sola sección óptica de la zona de la faringe enmarcada en la figura 4 utilizando a) DSLM-Gauss y b) 2p-DSLM-Gauss. c) Gráfica de los perfiles de intensidad a lo largo de las líneas marcadas para ambas modalidades. Los perfiles de intensidad fueron normalizados al máximo de cada distribución.

analizadas, las cuales corresponden a la parte de la faringe seleccionada por el recuadro en las figuras 17e y 17f, respectivamente. Analizando la figura 18c es posible observar que la modalidad 2p-DSLM-Gauss presenta una menor señal de fondo. Además, se aprecian mejor algunos detalles de la estructura con un mayor contraste.

Por otro lado, para probar el uso de haces Bessel y explorar su impacto en la longitud del campo de visión, se preparó una muestra con varios *C. elegans* colocados en el mismo plano y alineados a lo largo de la dirección de incidencia (x) del haz de excitación (figura 19a). Para los cuatro casos el haz fue escaneado a la amplitud necesaria para generar una hoja de luz que llenara el campo de visión en la dirección y. Los parámetros experimentales utilizados para obtener las imágenes de fluorescencia de la figura 19 son resumidos en la tabla 3. En esta última tabla se aprecia que la modalidad 2p-DSLM-Bessel es la que requiere el mayor tiempo de integración de la CCD y la potencia más alta de excitación, mientras que el mismo nível de señal de fluorescencia puede ser obtenido con la modalidad DSLM-Gauss con un menor tiempo de integración y con potencias de excitación muy bajas (< 1 mW).

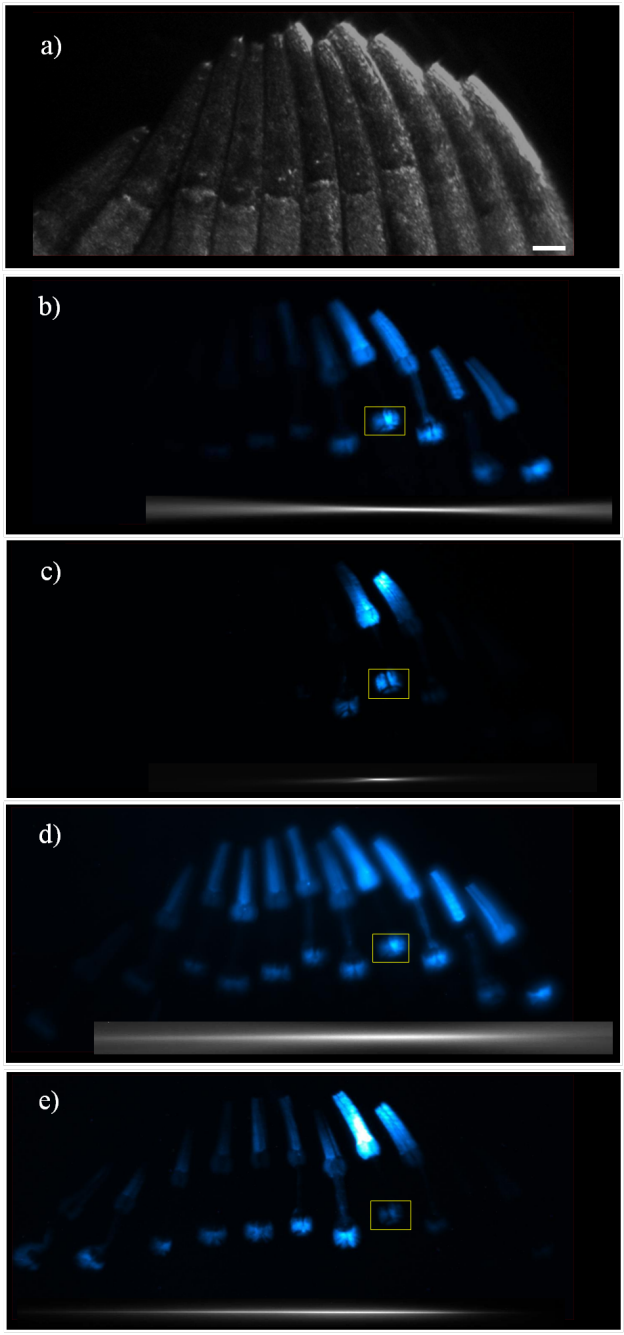

Figura 19. Imágenes de fluorescencia de un conjunto de C. elegans alineados a lo largo de la dirección x. La figura a) es una imagen de campo claro tomada con iluminación oblícua y usada como referencia. En las figuras b)-e) se muestran las imágenes de proyección de máxima intensidad adquiridas con las cuatro modalidades: b) DSLM-Gauss, c) 2p-DSLM-Gauss, d) DSLM-Bessel y e) 2p-DSLM-Bessel. Debajo de cada imagen se muestra la posición y la extensión de las líneas de luz utilizadas para la excitación. Para cada modalidad se tomó un stack de 50 imágenes con un paso de 2 μm. La barra de escala representa 50 μm.

Tabla 3. Sumario de los parámetros experimentales empleados en la figura 19.

Modalidad	Parámetros			
	Longitud de onda (nm)	Pot. Promedio (mW)	Tiempo Int. (ms)	Incremento en z (μm)
DSLM-Gauss	430	< 1	2000	2
2p-DSLM-Gauss	860	72	2000	2
DSLM-Bessel	430	< 1	2000	2
2p-DSLM-Bessel	860	290	3000	2

Las figuras 19b-e muestran las imágenes de proyección de máxima intensidad para las cuatro modalidades. Debajo de cada figura se incluyen las líneas de luz de excitación (obtenidas previamente y mostradas en la figura 14), esto con la finalidad de indicar el campo de visión efectivo esperado. De la figura 19 se aprecia el incremento del campo de visión en la dirección x cuando se utilizan haces Bessel en ambos regímenes (lineal y no-lineal). En términos de homogeneidad de imagen, la modalidad DSLM-Bessel resulta ser mejor que cualquier otra (ver figura 19d). Sin embargo, la imagen generada es más borrosa y es atribuido a los lóbulos laterales característicos de los haces Bessel. Finalmente, con la modalidad 2p-DSLM-Bessel se obtiene una mejor calidad en la imagen (mayor contraste), además se logra un mayor campo de visión con una buena resolución axial.

Para cuantificar los resultados obtenidos para cada una de las modalidades, se seleccionaron las imágenes correspondientes a una parte de la faringe (representadas por los recuadros en la figura 19). Estas imágenes fueron tomadas en la misma sección óptica y se muestran en las figuras 20a-d. La gráfica de los perfiles de intensidad de las líneas representadas en las secciones ópticas se muestra en la figura 20e. En esta última figura, al igual

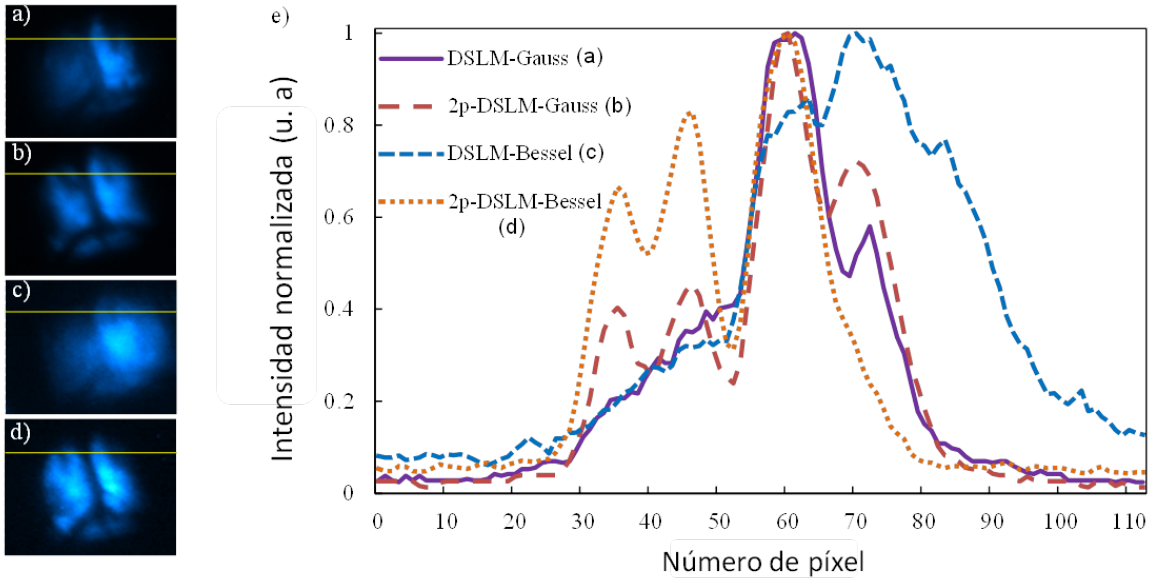

Figura 20. Perfiles normalizados a lo largo de la línea seleccionada tomados para todas las modalidades. Imágenes de fluorescencia tomadas de la zona de la faringe enmarcada en la figura 6 para a) DSLM-Gauss, b) 2p-DSLM-Gauss, c) DSLM-Bessel y d) 2p-DSLM-Bessel. e) Perfiles de intensidad a lo largo de la línea seleccionada, la intensidad de cada perfil fue normalizada a su valor máximo respectivo.

que en la figura 18, se puede apreciar que las modalidades que utilizan excitación no-lineal proporcionan un mejor contraste de las diferentes estructuras de la muestra, así como una disminución en el ruido de fondo.

3.6 Discusión

Se ha construido un sistema DSLM vérsatil que permite cambiar fácilmente de una modalidad de excitación a otra sin afectar significativamente las propiedades de la hoja de luz (posición e inclinación). Gracias a esto, se ha podido realizar una comparación directa entre las diferentes modalidades de una sola sección óptica.

Haciendo un análisis comparativo de las diferentes configuraciones, se puede ver de la figura 19c que la modalidad 2p-DSLM-Gauss proporciona una mejor calidad de imagen (en términos de un mayor contraste y un menor ruido de fondo) que la modalidad DSLM-Gauss

(figura 19b). Sin embargo, su reducido campo de visión se vuelve una limitante en aplicaciones que requieran visualizar muestras grandes. En este caso, la modalidad 2p-DSLM-Bessel es la más apropiada ya que permite obtener imágenes en un mayor campo de visión y con una buena resolución axial. En este sentido, es importante mencionar que para los haces Bessel el campo de visión se incrementa hasta cuatro veces, comparado con los haces Gaussianos, sin comprometer la resolución axial (ver tabla 1). Esto se puede apreciar claramente en la figura 19e, en donde la calidad de la imagen para la modalidad 2p-DSLM-Bessel es equivalente a la obtenida por 2p-DSLM-Gauss pero con una mayor visualización de faringes.

Para el caso DSLM-Bessel, la resolución de la imagen es degradada, lo que atribuimos a los lóbulos laterales de los haces Bessel, los cuales generan cierta fluorescencia que causa un ensanchamiento en la PSF axial por un factor de casi 3 (ver tabla 1). Como una consecuencia, las imágenes son degradadas en términos de contraste y ruido de fondo, esto se puede apreciar en las figuras 19d y 20e. Sin embargo, para estudios en los cuales la resolución no es un factor esencial, la modalidad DSLM-Bessel es una buena opción ya que proporciona imágenes muy homogéneas con un campo de visión grande. Además, se generan señales de fluorescencia altas con potencias de excitación relativamente pequeñas (< 1 mW).

En cuestión de eficiencia de fluorescencia, las modalidades que utilizan excitación lineal resultan ser mejores (ver tablas 2 y 3). Las potencias de excitación necesarias para obtener la misma señal de fluorescencia son menores a 1 mW en los casos lineales, y de unas docenas e incluso hasta cientos de mW para los casos no-lineales. En particular, la modalidad DSLM-Gauss muestra una buena compensación entre la generación de fluorescencia, resolución y campo de visión. Esta modalidad puede ser de gran utilidad para visualizar muestras que no toleran altas potencias de excitación, o bien, cuando se trata de muestras fluorescentes débiles o moderadas.

Finalmente, con respecto a los valores de potencia del láser utilizadas en los experimentos y reportados en las tablas 2 y 3, es importante recalcar que para la máxima potencia usada, la cual corresponde a la modalidad 2p-DSLM-Bessel, la intensidad pico en el plano de la muestra fue alrededor de 100 GW/cm^2. Este valor está por debajo del valor umbral (200 GW/cm^2) para evitar fototoxicidad en experimentos de visualización de largo plazo (König *et al.*, 1997). De hecho, en todos los experimentos realizados en este trabajo, los *C. elegans* se recuperaron en los siguientes 30 minutos después de haber sido anestesiados, todos ellos mostraron nuevamente una buena actividad en la plataforma de agar en la cual estaban inmersos.

Capítulo 4

Monitoreo y escritura láser en compósitos de nanopartículas de plata utilizando microscopía de generación de segundo armónico

En el capítulo anterior se mostró una nueva técnica de microscopía no-lineal basada en el proceso de TPEF y en una excitación plana la cual es creada mediante una hoja de luz láser digitalmente escaneada.

En contraste, en este capítulo se muestra una aplicación de la microscopía no-lineal de generación de segundo armónico (GSA) para procesar materiales compuestos con nanopartículas metálicas. El capítulo se inicia con una breve descripción de los antecedentes y aplicaciones de este tipo de materiales. Después se muestra el sistema de microscopía no-lineal de barrido de GSA implementado para estos fines y posteriormente se presentan los resultados obtenidos de la escritura y monitoreo de patrones en forma de guía de onda en una muestra de nanopartículas elongadas de plata incrustadas en una matríz de sílice. Asimismo, se hace un estudio del proceso de daño de las nanopartículas en función de la energía del láser, polarización y velocidad de escaneo.

4.1 Antecedentes

Los materiales nanoestructurados compuestos de nanopartículas metálicas han sido de gran interés en años recientes debido a la posibilidad de utilizar sus propiedades ópticas no-lineales en el diseño de nuevos nanodispositivos fotónicos (Matsui, 2005). De manera particular, Rocha-Mendoza et al., (Rocha-Mendoza *et al.*, 2011) y Rangel-Rojo et al., (Rangel-Rojo *et al.*, 2009) han estudiado las propiedades ópticas no-lineales de segundo y tercer orden de nanopartículas elongadas y esféricas de plata (NPs-Ag) incrustadas en sílice (SiO_2) mediante

experimentos de GSA y z-scan. Para el caso de NPs-Ag elongadas, las propiedades ópticas lineales y no-lineales dependen fuertemente de la geometría, tamaño y distribución de las nanopartículas, así como de la polarización de la luz incidente. Estas características hacen a estos materiales atractivos para la fabricación de guías de onda con propiedades ópticas lineales y no-lineales.

Una técnica comúnmente utilizada para la fabricación de NPs-Ag elongadas es la de implantación de iones metálicos en matrices dieléctricas (Oliver *et al.*, 2006). Este método de fabricación ofrece un buen control sobre el tamaño, concentración y profundidad de formación de las nanopartículas. Sin embargo, a pesar de ser un método ampliamente usado en la fabricación de nanopartículas metálicas o capas delgadas de las mismas, usarlo para fabricar patrones de estructuras fotónicas de guiado representa un cierto grado de dificultad experimental. Una alternativa fácil de producir patrones de guías de onda en este tipo de muestras, es mediante la escritura directa usando láseres de pulsos ultracortos en el régimen de fs ($\sim 10^{-15}$ segundos) a través de un sistema de microscopía no-lineal. En esta técnica se utiliza el daño para la fabricación y caracterización de guías de onda en materiales con propiedades ópticas no-lineales de segundo orden tales como el niobato de litio (Thomson *et al.*, 2006), pero en estos casos las energías utilizadas son muy altas, del orden de cientos de nJ, y emplean sistemas de amplificación de pulsos de fs que son muy costosos.

En este contexto, una parte del trabajo que se presenta en esta tesis consiste en utilizar un sistema de microscopía no-lineal para escribir y caracterizar patrones en forma de guías de onda en muestras que contienen NPs-Ag elongadas incrustadas en sílice. Se mostrará que para lograr esto se utilizan pulsos de fs con energías de tan sólo un par de nJ, las cuales se obtienen fácilmente con osciladores de Ti:zafiro, evitando en este sentido modificaciones estructurales del material en bulto debidas a procesos de calentamiento inducidos por el

mismo láser, lo cual también ha sido utilizado para la fabricación de guías de onda (Gattass y Mazur, 2008). En pocas palabras se propone el uso de un sistema de microscopía no-lineal para escribir y monitorear, de una manera fácil y versátil, diferentes patrones de estructuras fotónicas de guiado.

4.2 Fabricación de las muestras

A continuación se describe el proceso de fabricación de las muestras con NPs-Ag elongadas embebidas en sílice, mismas que fueron fabricadas en el Instituto de Física de la UNAM por el grupo de la Dra. Alicia Oliver (Oliver *et al.*, 2006) y consta de dos fases.

La primera fase consiste en producir NPs-Ag esféricas mediante un proceso de implantación iónica utilizando un acelerador de iones Tándem de 3 MV (NEC 9SDH-2 Pelletron). Se implantaron iones de plata (Ag^{2+}) a una energía de 2 MeV en placas de sílice de alta pureza (NSG ED-C, Nippon silica glass) a temperatura ambiente. La fluencia de los iones metálicos y el rango proyectado medidos fueron 2.4×10^{17} Ag/cm^2 y 0.9 μm, respectivamente. El resultado es una muestra que contiene iones aislados. Después, se le hace un tratamiento térmico a la muestra a 600 $^{\circ}C$ en una atmósfera reductora de 50% N_2 + 50% H_2 durante una hora, esto con la finalidad de nuclear las nanopartículas lo mayormente posible. El resultado de este proceso es una película delgada que contiene NPs-Ag esféricas (mostradas esquemáticamente en la figura 21a).

En la segunda fase, la muestra con NPs-Ag esféricas es irradiada (a temperatura ambiente) a un ángulo de 45° con respecto a la superficie de la muestra con iones de silicio (Si) a una energía de 8 MeV y una fluencia de alrededor de 1×10^{16} Si/cm^2. Al final de esta segunda fase la muestra resultante tiene una capa de 0.5 μm de grosor que contiene NPs-Ag elongadas a una profundidad de 1 μm dentro de la matríz de sílice y alineadas en la dirección de la segunda

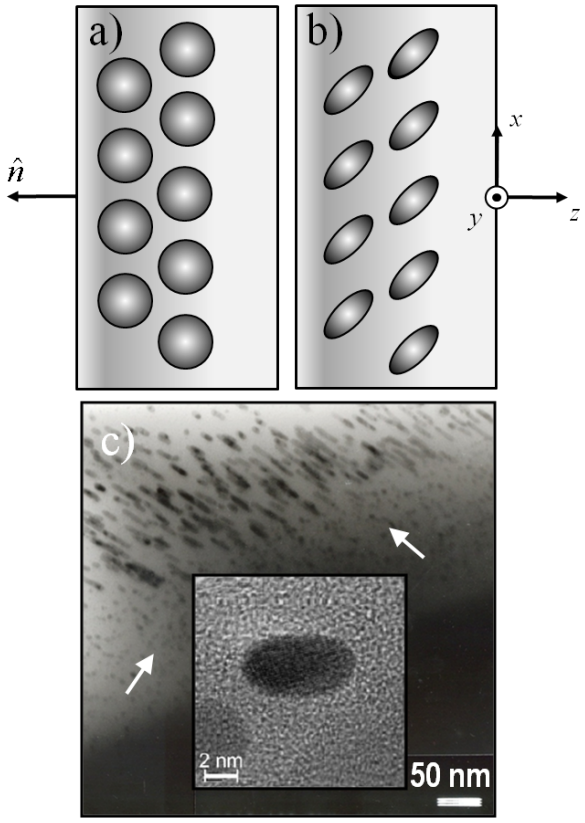

Figura 21. Esquema del proceso de fabricación de las NPs-Ag. a) primera fase: la implantación iónica seguida de un tratamiento térmico resulta en NPs-Ag esféricas. b) segunda fase: una segunda implantación iónica del material huésped a 45° resulta en NPs-Ag elongadas. En la figura *xyz* representan el sistema de coordenadas en el laboratorio y $\hat{n}$ es la normal a la superficie de la muestra. c) Imagen TEM de la capa delgada que contiene NPs-Ag elongadas alineadas en una dirección preferente. Las flechas indican las NPs-Ag esféricas que quedan después del segundo proceso de implantación iónica. El recuadro muestra la imagen de la morfología de una nanopartícula elongada.

implantación. Es decir, los ejes largos de las NPs-Ag están inclinados 45° con respecto a la normal del sustrato y yacen en el plano *xz* según las coordenadas *xyz* del laboratorio como se observa en la figura 21b. Cuando la muestra es vista de frente, la proyección de los ejes mayores de las NPs-Ag elongadas apuntan en la dirección $\hat{x}$. Las NPs-Ag elongadas resultantes tienen una geometría en forma de esferoides alargados con un diámetro promedio de su eje menor de 5 nm y una razón largo/ancho de 1.7. La distribución de tamaño obtenida de la estadística sobre 290 mediciones muestra una distribución de diámetro centrado en

5.9 nm con una desviación estándar de 1.1 nm. La imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) en la figura 21c muestra los diferentes tamaños de las NPs-Ag y su distribución aleatoria (pero alineada en una dirección preferente) obtenida durante el segundo proceso de implantación iónica. El recuadro muestra la morfología de una de las NPs-Ag elongadas (Oliver *et al.*, 2006; Rangel-Rojo *et al.*, 2009). La distancia promedio entre las NPs-Ag elongadas es aproximadamente de 25 nm y en las NPs-Ag esféricas restantes es de 13 nm, es decir, casi un orden de magnitud más grande que los tamaños de las nanopartículas.

4.3 Arreglo experimental

El sistema de microscopía no-lineal de GSA se muestra en la figura 22, el cual consiste de un oscilador láser de Titanio:zafiro (NJA4; Clark:MXR), bombeado con un láser de 5 W a 532 nm (Millennia Vs; Spectra Physics), que emite pulsos centrados en 830 nm y con una duración de 88 fs a una taza de repetición de 94 MHz. La potencia promedio a la salida del oscilador es de 350 mW y es controlada mediante una placa retardadora de media longitud de onda ($\lambda/2$) y un polarizador. El haz láser es expandido y colimado, mediante un arreglo telescópico, para llenar el área de los dos espejos galvanométricos (6230H, Cambridge Technology) los cuales son controlados por una fuente regulada de voltaje (Cambridge Technology, MicroMax 67321H) y conectados a los puertos de salida de una tarjeta analógica-digital. Después, se utiliza un segundo arreglo telescópico formado por una lente de barrido (SL) y una lente de tubo (TL) de 50 mm de diámetro y con distancias focales de $f_{SL} = 150$ mm y $f_{TL} = 250$ mm, respectivamente. Por un lado, este arreglo telescópico permite que los planos de los espejos galvanométricos y de la apertura de entrada del objetivo del microscopio invertido (Eclipse TE2000U; Nikon) sean conjugados; es decir, la imagen del perfil del haz localizado entre los dos espejos galvanométricos se forma justo en la parte de entrada del objetivo de microscopio.

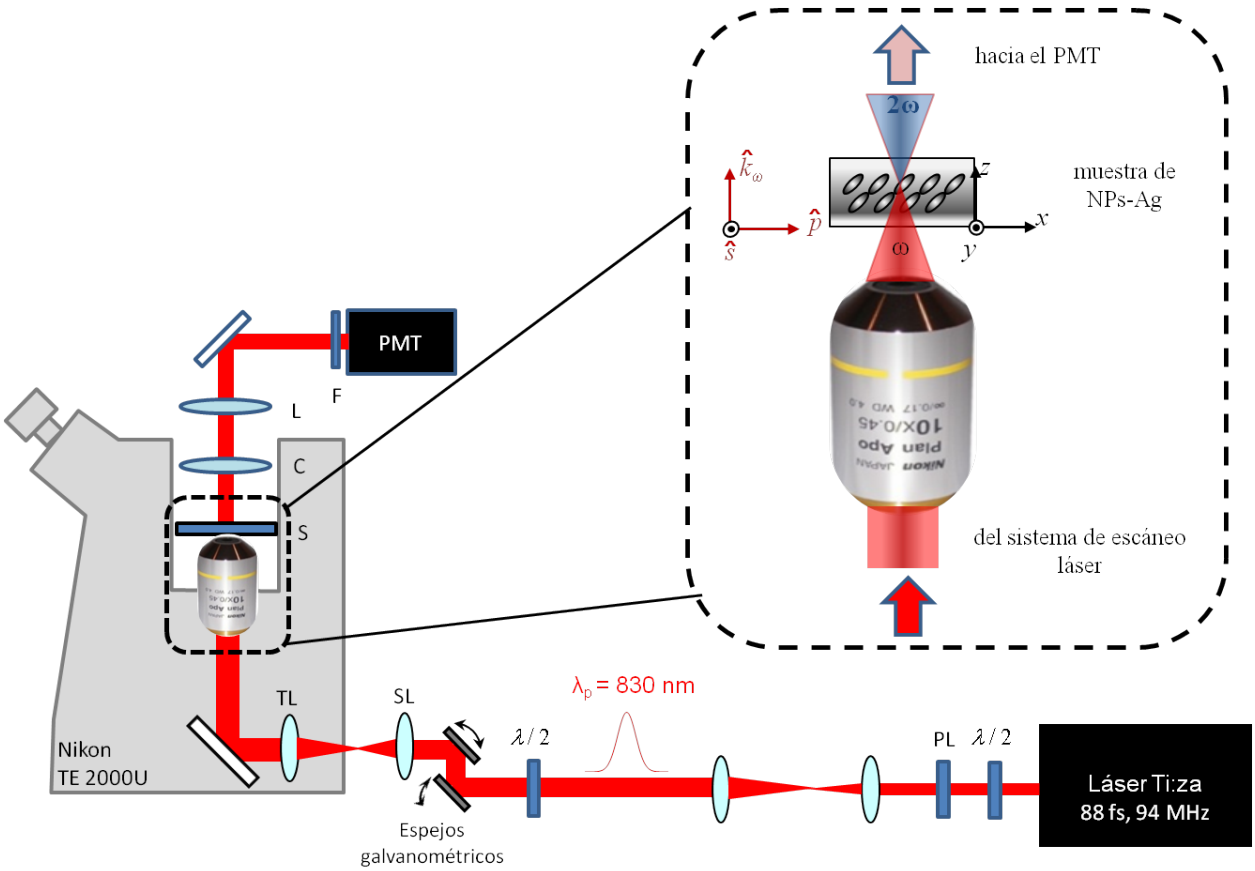

Figura 22. Esquema del sistema de microscopía no-lineal implementado. En el recuadro se muestra el esquema del haz utilizado para el proceso de excitación y escritura sobre la muestra de NPs-Ag. En la figura xyz representan el sistema de coordenadas en el laboratorio, $\hat{p}$ y $\hat{s}$ representan las polarizaciones paralela y perpendicular del haz incidente, respectivamente, $\hat{k}_\omega$ indica la dirección de propagación del haz de excitación. La señal de GSA es colectada en transmisión por un PMT.

Esto garantiza pivotear el haz en esta posición menteniendolo inamovible durante el barrido del haz y conservando así la intensidad que entra al objetivo. Asimismo, el área de la apertura de entrada del objetivo se llena completamente por el haz expandido, garantizando de esta manera el máximo aprovechamiento de la resolución óptica del objetivo.

En este experimento se utilizó un objetivo de microscopio de 10× (NA=0.30) para enfocar los pulsos de fs en la muestra, la cual se coloca en la platina de movimiento xy del microscopio. El diámetro del haz (FW1/e^2M) medido antes del objetivo de microscopio es $D_{Beam} = 4.7$

mm y de acuerdo a (Helmchen y Denk, 2005), el diámetro de la apertura del objetivo está dada por $D_{BA} = 2(NA)f_{TL}/M$, donde NA, f_{TL} y M representan la apertura numérica del objetivo, la distancia focal de la lente de tubo y la magnificación del objetivo, respectivamente. En nuestro caso, se tiene que $D_{BA} = 15$ mm, y así $D_{Beam}/D_{BA} = 0.31$ lo cual da un factor $F = 1.55$ (véase (Helmchen y Denk, 2005)). Las resoluciones lineales lateral y axial están dadas por $\delta_{x,y} = \lambda F/2NA$ y $\delta_z = 2\lambda F/(NA)^2$, respectivamente. En nuestro caso (tomando $\lambda = 830$ nm), se calcula que $\delta_{x,y} = 2.1\ \mu m$ y $\delta_z = 34\ \mu m$. Sin embargo, la resolución lateral medida en nuestro sistema es de 3.4 μm.

En el recuadro de la figura 22 se representan solamente los haces de excitación y colección del microscopio. La orientación de las NPs-Ag elongadas se muestran en el sistema coordenado *xyz* del laboratio. Los ejes mayores de las NPs-Ag están inclinados 45° con respecto a la normal del sustrato y yacen en el plano *xz*. Si la muestra se ve de frente, entonces la proyección de los ejes mayores de las NPs-Ag elongadas están a lo largo de la dirección $\hat{x}$. La polarización lineal del láser también fue ajustada en la dirección $\hat{x}$ para una mejor optimización de la señal de GSA (ver sistema coordenado $(\hat{p},\hat{s},\hat{k})$ en la figura 22). La señal de GSA generada es colectada en transmisión, para esto se utiliza la lente condensadora del microscopio y una segunda lente para formar un sistema telescópico para desescanear el haz. Para filtrar la señal se utilizó un filtro interferométrico pasabanda ($FF02-435/40$; Semrock) centrado en 435 nm y con un ancho espectral de 40 nm. La señal filtrada fue detectada con un tubo fotomultiplicador, PMT, (R2557; Hamamatsu) cuya ganancia puede ser variada utilizando una fuente de alto voltaje en el rango de 500 a 1100 V. La señal de corriente multiplicada por el PMT fue convertida a una señal de voltaje utilizando un preamplificador de corriente a voltaje (Oriel, 70710) con una razón de $10^6 - 10^8$ V/A. La sincronización del barrido láser y la detección de la señal de GSA son sincronizados mediante una tarjeta de

adquisición de datos (BNC2110; National Instruments) y un programa de interface escrito en LabWindows CVI. Las imágenes se procesan con el software ImageJ, similar al capítulo 3.

4.3.1 Escritura de patrones utilizando el láser

La escritura de patrones utilizando el láser sobre las NPs-Ag se realiza en tres pasos: 1) el plano de la capa delgada de NPs-Ag es ubicado midiendo la señal de GSA que de ahí se origina (Rocha-Mendoza *et al.*, 2011). La señal es maximizada, mientras se van adquiriendo las imágenes de la muestra, rotando la polarización del láser y ajustando el foco (dirección $\hat{z}$) utilizando el sistema de enfoque del microscopio. La adquisición de imágenes se realizó a una energía por pulso de 0.37 nJ (que corresponde a 35 mW de potencia promedio) con la finalidad de evitar daño en la muestra de NPs-Ag; tal y como se demuestra en la sección de resultados. 2) Los patrones en forma de guía de onda son escritos usando una energía por pulso de 1.6 nJ (potencia promedio de 150 mW). La escritura se puede realizar de dos maneras: escaneando el haz en una línea usando los espejos galvanométricos o bien, para escalas grandes (del orden de milímetros), trasladando manualmente la muestra sobre el punto focal del láser moviendo la platina xy del microscopio. Esta última fue la que se utilizó en nuestro caso, ya que la longitud de la muestra es de aproximadamente 4 mm. Cada línea fue escrita moviendo la platina del microscopio hacia adelante y hacia atrás (ida y vuelta) con una velocidad de alrededor de 4 mm/s. 3) Finalmente, los patrones escritos son evaluados mediante la adquisición de imágenes de GSA tal y como se realizó en el primer paso.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Monitoreo y escritura de guías

La figura 23a muestra el espectro de absorción plasmónica de las muestras de NPs-Ag usando luz linealmente polarizada para las polarizaciones paralela ($\hat{p}$) y perpendicular ($\hat{s}$) al plano de incidencia (Rocha-Mendoza *et al.*, 2011). Puede apreciarse que la forma de los espectros depende de la polarización de la luz. Las mediciones fueron realizadas utilizando un

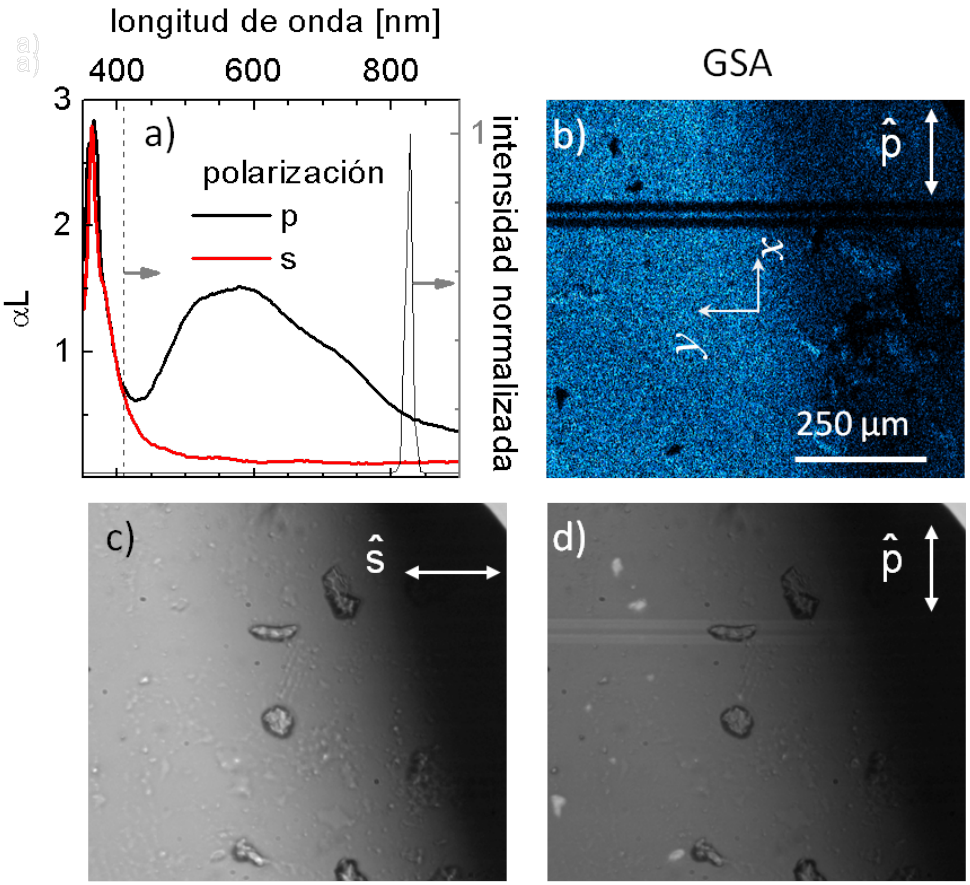

Figura 23. a) Espectro de absorción plasmónica de las NPs-Ag elongadas para las polarizaciones $\hat{p}$ y $\hat{s}$. También se muestra el espectro del láser utilizado. b) Imagen de GSA después del proceso de escritura, la señal es máxima para la polarización $\hat{p}$. Imágenes de transmisión utilizando la lámpara de halógeno del microscopio para la polarización en c) $\hat{s}$ y d) $\hat{p}$. La proyección del eje mayor de las NPs-Ag está en la dirección del eje x.

espectrofotómetro UV-visible (StellarNet) a incidencia normal (0°). Los espectros de absorción fueron graficados midiendo la luz transmitida sobre la muestra y usando la definición $\alpha L = ln(1/T)$; donde L es el grosor de la muestra (1 mm en nuestro caso) y T es la transmitancia de la muestra. A incidencia normal, una sola resonancia plasmónica alrededor de 365 nm es obtenida para la polarización ($\hat{s}$) (espectro de color rojo), la cual está asociada con el eje menor del plasmón de superficie y puede ser explicado por la disminución del tamaño de las nanopartículas durante el segundo proceso de implantación iónica. La resonancia a 570 nm obtenida con la polarización $\hat{p}$ (espectro negro) está asociada con el eje largo del plasmón de superficie y su ensanchamiento es atribuido a las diferentes elongaciones de las nanopartículas formadas en la matriz de sílice. En este último caso, también se presenta una resonancia en 365 nm y se atribuye a la fracción restante de nanopartículas esféricas que quedan después del segundo proceso de implantación durante la fabricación. El espectro del láser también se muestra en la figura 23a, donde se puede apreciar claramente que existe una absorción significante para la polarización $\hat{p}$ (a lo largo del eje mayor de las NPs-Ag).

Por otro lado, la figura 23b muestra la imagen de GSA tomada después del proceso de escritura sobre la muestra. La ausencia de señal en la zona irradiada indica que hubo un daño. La señal de GSA fue máxima cuando la polarización del láser se ajustó en la dirección $\hat{p}$, es decir, paralela a la dirección de la orientación de los ejes mayores de las NPs-Ag (eje x). Después del proceso de escritura, se tomaron imágenes de transmisión con el mismo microscopio utilizando la lámpara de halógeno que trae integrada y polarizando la luz de la misma. Nótese que cuando la imagen de transmisión se toma con la luz polarizada en $\hat{s}$ (ver figura 23c), tanto la zona dañada como el resto de la muestra no presentan absorción de la luz y por lo tanto no se aprecia el daño. Sin embargo, cuando se utiliza luz polarizada en la dirección $\hat{p}$ (ver figura 23d) la zona dañada se vuelve visible, esta transmisión en la zona de

los canales escritos significa que no hay absorción plasmónica y por lo tanto que una evidente modificación estructural ha ocurrido en el compuesto de NPs-Ag. Dado que la capa delgada de NPs-Ag está embebida a 1 μm dentro de la matriz vítrea, entonces el daño no puede ser debido a un proceso de ablación ya que no hay manera de que las nanopartículas sean expulsadas hacia la superficie del sustrato. De hecho, no se observó daño en la superficie del sustrato posterior a la escritura láser.

4.4.2 Estudio del daño en las NPs-Ag

Se han hecho estudios con pulsos de nanosegundos, en los que se logra redisolver las NPs-Ag. Precisamente, Crespo-Sosa et al., (Crespo-Sosa *et al.*, 2007) ha reportado numérica y experimentalmente la inducción de daño láser por calentamiento acumulado en muestras de NPs-Ag esféricas utilizando pulsos de nanosegundos. Demuestra que el mecanismo responsable del daño del compuesto es el calentamiento inducido por el láser de excímero utilizado (con una duración de pulso de 55 ns y centrado en 308 nm), cuya longitud de onda está cerca de la resonancia plasmónica del compuesto, elevando así la temperatura de las nanopartículas hasta su punto de fusión. En tal caso, se utilizaron muestras de NPs-Ag esféricas, responsables de la absorción plasmónica a 400 nm; las cuales, a diferencia de las NPs-Ag elongadas utilizadas en esta tesis, no presentan absorción en el infrarrojo. Como se demuestra más adelante, la absorción presente en las NPs-Ag elongadas jugará un papel importante en el proceso de daño.

En contraste, para investigar la energía por pulso necesaria para modificar el compósito de NPs-Ag elongadas y sílice, utilizando fuentes de femtosegundos, se realizó un estudio de la señal del PMT en función de la fluencia, polarización del láser y de la velocidad de escaneo. Los resultados se muestran en las figuras 24 y 25, donde cada punto de los datos corresponde

a la señal del PMT promediada en una sola imagen escaneada de alrededor de 250 μm^2. Se tomaron cinco imágenes consecutivas en la misma área a una energía por pulso fija, después se movió la muestra a un área adyacente y se realizó el mismo número de escaneos pero con una energía por pulso mayor y así sucesivamente. La energía por pulso del láser fue incrementada de 0.1 nJ hasta 1.5 nJ.

En la figura 24, los cuadrados, los círculos y los triángulos representan la señal del PMT promediada después de uno, dos y cinco escaneos, respectivamente. Las diferentes pendientes trazadas en la figura 24a son un indicativo de que dos procesos físicos diferentes ocurren

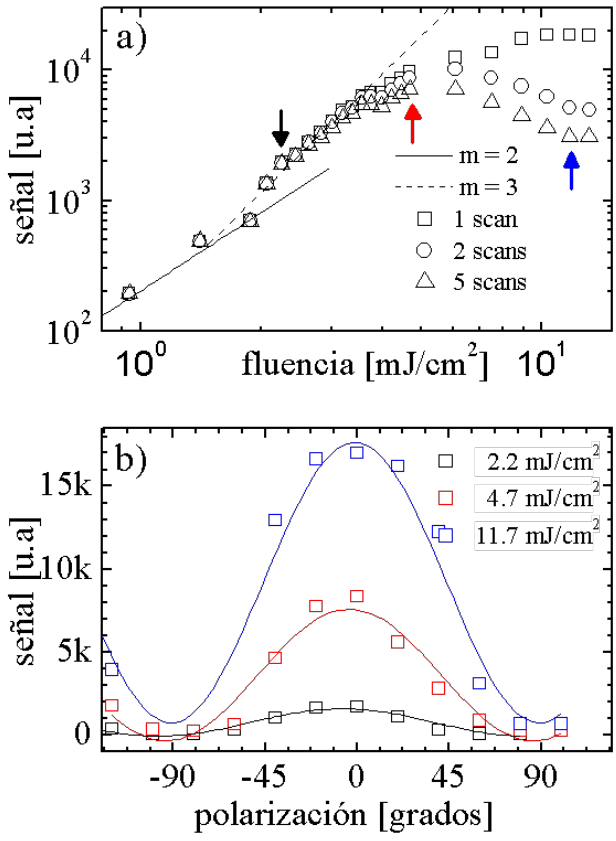

Figura 24. Señal del PMT como función de la fluencia del láser a) y ángulo de polarización b). Las flechas en a) indican las fluencias usadas en la figura b) tal y como están etiquetadas. Los cuadrados, círculos y triángulos representan uno, dos y cinco barridos del haz láser, respectivamente.

en las NPs-Ag conforme la fluencia del láser se incrementa. Por debajo de 2 mJ/cm^2 la señal se ajusta a una pendiente cuadrática la cual corresponde a un proceso óptico no-lineal de segundo orden (GSA) originado en el compuesto (Rocha-Mendoza *et al.*, 2011). La susceptibilidad macroscópica de segundo orden de la capa de NPs-Ag se origina de la suma coherente de las hiperpolarizabilidades con simetría cílindrica en primera aproximación simétricas cílindricamente asociadas a cada una de las nanopartículas. En contraste, para fluencias entre 2 y 3.5 mJ/cm^2 la pendiente de la señal se incrementa indicando que otros procesos físicos empiezan a tomar lugar. Este cambio de pendiente parece señalar el inicio de un proceso de daño a las nanopartículas. A partir de este rango de fluencias se pudo observar a simple vista la generación de "chispas" de luz en la muestra. Por lo tanto, el aumento percibido en la pendiente es seguramente debido a la luminiscencia de los destellos de luz generados, la cual no se filtra completamente por el filtro óptico (FF02 − 435/40; Semrock) colocado antes del PMT; es decir, las componentes espectrales que estén en el rango de 415-455 nm serán detectadas por el PMT. Para fluencias mayores a 3.5 mJ/cm^2 se observa un claro decaimiento de la señal para los subsiguientes escaneos, mientras que para una fluencia de 6 mJ/cm^2 dicho decaimiento de la señal es aún más evidente, siendo éste mayor conforme se aumenta el número de escaneos. Como se verá más adelante, este decaimiento de la señal está asociado a una remoción considerable de NPs-Ag. Por otro lado, en la figura 24b se muestra que independientemente de la fluencia depositada en el compuesto de NPs-Ag, la señal depende de la polarización del láser, siendo máxima cuando el haz del láser está polarizado en la dirección $\hat{p}$ (polarización paralela al eje mayor de las nanopartículas). Esto indica que el proceso de daño está relacionado con la absorción plasmónica de las NPs-Ag elongadas.

La influencia de la velocidad del barrido láser en el proceso de daño se muestra en la

figura 25, donde se grafica la señal en función del tiempo de vuelo por micrómetro (el inverso de la velocidad de barrido) para las tres fluencias de 2.2, 4.7 y 11.7 mJ/cm^2 indicadas con flechas en la figura 24a. Para una fluencia de irradiación de 2.2 mJ/cm^2 no se observa un decaimiento significativo de la señal después de cinco barridos (triángulos negros), indicando que no se induce daño alguno en las NPs-Ag en el rango de 0.8 a 1.6 mm/s (1.3 a 0.6 $ms/\mu m$, respectivamente). Sin embargo, para una fluencia de 4.7 mJ/cm^2 y un tiempo de vuelo de 0.3 $ms/\mu m$ (3.3 mm/s), se puede observar un decaimiento de la señal para los barridos posteriores indicando que ha ocurrido un cambio morfológico o bien una disolución de algunas nanopartículas. El incremento inicial de la señal con respecto al tiempo de vuelo indica una posible contribución de la señal de GSA debida a las nanopartículas restantes en el compuesto; al incrementar el tiempo de vuelo dicha contribución disminuye debido a la

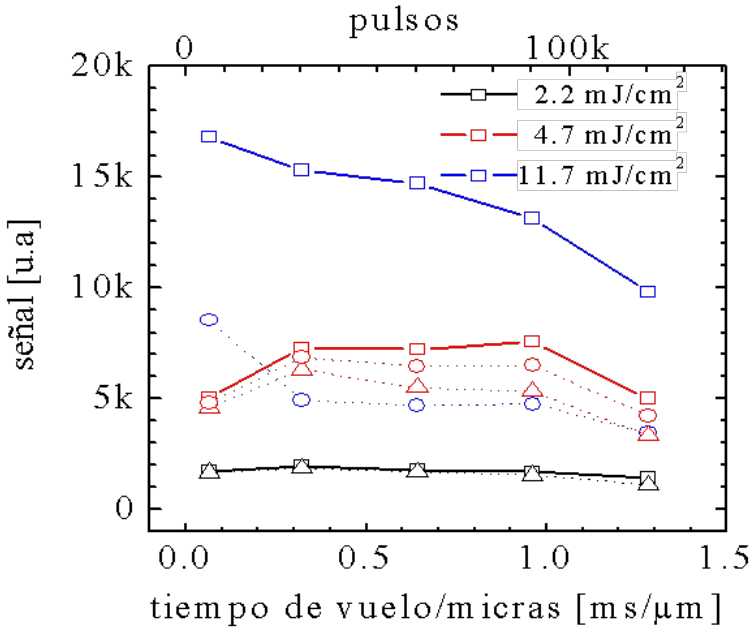

Figura 25. Señal del PMT como función del tiempo de vuelo por micrómetro a diferentes fluencias (mismas utilizadas en la figura 24). Los cuadrados, círculos y triángulos representan uno, dos y cinco barridos, respectivamente.

ausencia de nanopartículas. Para una fluencia de 11.7 mJ/cm^2 la señal ya no es reproducible después del primer barrido tal y como se demuestra con la caída drástica de señal al realizar un segundo barrido (círculos y líneas punteadas azules). De acuerdo a Crespo-Sosa et al. (Crespo-Sosa *et al.*, 2007), diez pulsos de 55 ns a 2 J/cm^2 son suficientes para fundir las nanopartículas. En nuestro caso no es posible alcanzar tal punto de fusión ya que las fluencias utilizadas son tres ordenes de magnitud menores. Resumiendo las figuras 24 y 25, se puede observar que el decaimiento de la señal es evidente para fluencias mayores a 4.7 mJ/cm^2 y tiempos de vuelo de 0.3 $ms/\mu m$ ($\sim 28 \times 10^3$ pulsos/μm), indicando que estas son las condiciones en las que ocurre el daño de las nanopartículas. Es importante mencionar que, debido a las bajas fluencias y a las velocidades de barrido utilizadas para escribir los patrones en forma de guía de onda, se evita el daño debido a un proceso de acumulación de calor en la sílice (Eaton *et al.*, 2008).

Asimismo, a diferencia de Crespo-Sosa et al., (Crespo-Sosa *et al.*, 2007), quien utilizó pulsos de nanosegundos en el ultravioleta, en nuestros experimentos se utilizaron pulsos de fs en el infrarrojo, es decir, una duración de pulso mucho más corta que el tiempo de termalización de las NPs-Ag el cual está en el rango de picosegundos (Voisin *et al.*, 2001), por lo tanto, la energía por pulso es relativamente baja para generar incrementos de temperatura considerables como se vió en la sección 2.5 del Capítulo 2. No obstante, el uso de un tren de pulsos a una alta taza de repetición (100 MHz) puede producir un incremento de temperatura el cual se acumula significantemente de pulso a pulso. A decir, la temperatura de fusión de las NPs-Ag es menor que la temperatura de fusión de la plata en bulto y de la sílice; siendo del orden de $400 - 600\ ^{\circ}C$ para NPs-Ag con radios de $2 - 3$ nm, respectivamente (Kofman *et al.*, 1994). Para estas condiciones, no se descarta entonces la posibilidad de una redisolución de las nanopartículas debida a un proceso térmico. Pero por otra parte,

debido al carácter de pulsado de la fuente se tienen valores altos de irradiancia pico en los experimentos (alrededor de $I_{pico} = 200\ GW/cm^2$), lo cual implica que procesos no-lineales de absorción multifotónica también deben de estar presentes. La observación de luminiscencia de luz blanca en los experimentos, debido a dichas irradiancias altas, indican la formación de un plasma producido por tales procesos multifotónicos. Estos procesos ocurren en la duración de un solo pulso, por lo tanto pueden llevarse a cabo antes de que la disolución térmica inicie.

Por otro lado, cabe la posibilidad de que en nuestros experimentos las NPs-Ag regresen a su estado iónico (Ag^+) por medio de procesos multifotónicos que ocurren justo en la zona modificada. De hecho el proceso inverso fue observado por Masuda et al., (Masuda *et al.*, 2003), quien demuestra el uso de pulsos de fs para reducir, mediante procesos multifotónicos, iones de plata (Ag^+) a "racimos" de plata, y con ello generar microestructuras 3D en vidrio Foturan (vidrio dopado con plata, cerio y antimonio).

Entonces, ya sea por un proceso térmico, un proceso de absorción multifotónica o ambos, el daño en las nanopartículas es más probable que esté asociado a una redisolución de plata en la matriz de sílice, lo que resulta en la desaparición de las NPs-Ag. Esto se sustenta por el hecho de que la señal disminuye considerablemente en las zonas irradiadas como se mostró en las curvas de las figuras 24a y 25, donde seguramente la señal caería a cero si se utilizaran valores de energía mayores a 1.6 nJ (energía máxima utilizada en este experimento) y con ello disolver por completo las nanopartículas. Otra manera de confirmarlo se muestra en la figura 26, donde se muestra la dependencia polar de la señal de GSA tomada después del proceso de escritura a diferentes fluencias, tiempo de vuelo y número de barridos. La imagen de GSA en el recuadro de la figura 26 tomada a 2 mJ/cm^2 muestra las diferentes zonas irradiadas. En la zona 1 no se induce daño láser. En la zona 2 se realizó un barrido a una fluencia de 4.7 mJ/cm^2 y un tiempo de vuelo de 1 $ms/\mu m$. En la zona 3 se realizaron cinco barridos

a una fluencia de 4.7 mJ/cm^2 y un tiempo de vuelo de 1 $ms/\mu m$. Finalmente en la zona 4 se mantuvo el haz láser estático y se utilizó la máxima fluencia (14.6 mJ/cm^2) disponible en nuestro sistema. De la gráfica 26 se puede apreciar que en la zona 4 la señal de GSA disminuye drásticamente debido al daño causado.

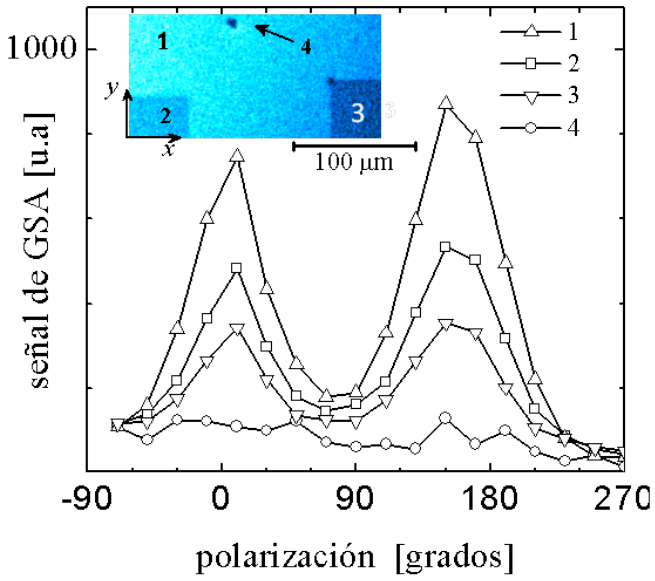

Figura 26. Dependencia polar de la señal de GSA tomada después del proceso de escritura a diferentes fluencias, tiempo de vuelo y número de barridos. La imagen de GSA en el recuadro tomada a 2 mJ/cm^2 muestra las diferentes zonas irradiadas: 1) No se induce daño láser; 2) escritura láser a una fluencia de 4.7 mJ/cm^2, tiempo de vuelo de 1 $ms/\mu m$ y se realizó un barrido; 3) escritura láser a una fluencia de 4.7 mJ/cm^2, tiempo de vuelo de 1 $ms/\mu m$ y se realizaron cinco barridos; 4) Daño causado usando la máxima fluencia (14.6 mJ/cm^2) disponible en nuestro sistema manteniendo el haz láser estático.

4.4.3 Escritura de guías

Finalmente, la viabilidad de la técnica de escritura/monitoreo implementada en este proyecto de tesis se demuestra en la figura 27. Un conjunto de cinco imágenes son tomadas antes a) y después b) del proceso de escritura, respectivamente. Esto con la finalidad de mostrar los patrones escritos en forma de guía de onda a través de toda la muestra de 5 mm de largo.

En la figura 27c se muestra el acercamiento de la zona marcada por el recuadro de la figura 27b, aquí se pueden apreciar claramente los dos canales escritos. Cada canal tiene un ancho de 9 μm aproximadamente, mientras que la zona intermedia entre ambos canales es de 5 μm. Nótese que el ancho de cada canal puede controlarse fácilmente moviendo lateralmente el haz láser mediante el sistema de escaneo. En la figura 27d se muestra el perfil de la señal de GSA de la línea seleccionada en la figura 27c, en donde se puede apreciar que la señal de GSA decae significativamente en el área irradiada indicando que el material compuesto ha sido dañado.

La región en donde se implantaron las nanopartículas presenta un índice de refracción

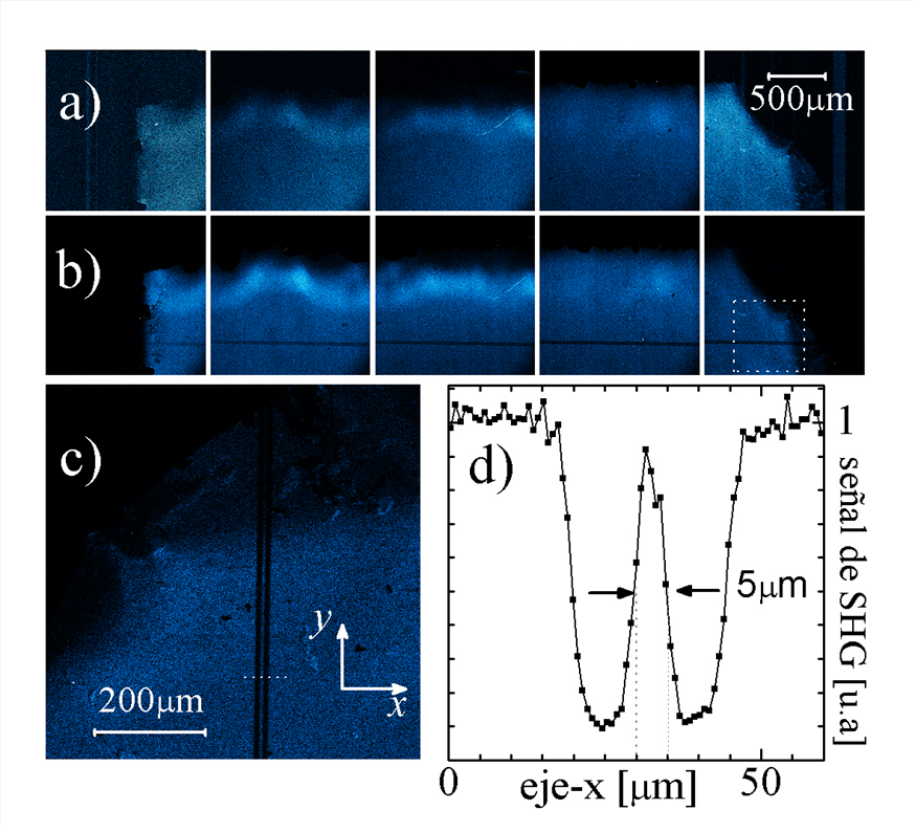

Figura 27. Imágenes de GSA tomadas antes a) y después b) del proceso de escritura. c) Acercamiento de la zona indicada por el recuadro en la figura b) donde se aprecian los patrones escritos en forma de guía de onda. d) Perfil de la señal de GSA de la línea trazada en la figura c).

considerablemente mayor al de la sílice ($\Delta n \sim 10^{-2}$), de ahí que puede ser posible realizar un guiado de luz en la zona intermedia (no irradiada) entre ambos canales. Por lo tanto, es evidente que con el sistema de microscopía no-lineal aquí implementado, es posible escribir y monitorear a la vez diferentes patrones de estructuras fotónicas (guías de canal y rejillas de Bragg, por ejemplo) en materiales nanoestructurados compuestos de nanopartículas metálicas, lo cual es complicado realizar con la técnica de implantación iónica.

Capítulo 5

Conclusiones

En este trabajo de tesis se presentó el desarrollo de un trabajo experimental en las áreas de la biofotónica y de materiales nanoestructurados. El contenido de la tesis se divide en dos fases.

En la primera fase se presentó una técnica innovadora de microscopía no-lineal de fluorescencia por excitación de dos fotones basada en una "excitación plana" la cual se crea mediante una hoja de luz láser digitalmente escaneada y que ha sido denotada como DLSM. El sistema que se implementó está diseñado para trabajar con cuatro modalidades: 1) régimen lineal con haces Gaussianos (DSLM-Gauss); 2) régimen no-lineal con haces Gaussianos (2p-DSLM-Gauss); 3) régimen lineal con haces Bessel (DSLM-Bessel) y 4) régimen no-lineal con haces Bessel (2p-DSLM-Bessel). Se utilizaron muestras vivas del nemátodo *C. elegans* para realizar una comparación entre cada una de las modalidades disponibles y de esta manera mostrar las ventajas de cada una de éstas.

En la segunda fase se mostró una aplicación de la microscopía no-lineal de generación de segundo armónico (GSA) para procesar materiales compuestos con nanopartículas metálicas. De manera particular, se utilizó una muestra de nanopartículas de plata elongadas embebidas en una matríz de sílice en la cual se realizó una "escritura láser" de patrones en forma de guía de onda, además se utilizó el mismo sistema de GSA para el monitoreo de los patrones escritos y para realizar el estudio del proceso de daño de las nanopartículas en función de la energía del láser, polarización y velocidad de escaneo.

Las conclusiones de esta tesis se presentan en dos secciones de acuerdo a las dos fases

mencionadas anteriormente.

5.1 Respecto a la microscopía no-lineal de TPEF basada en una hoja de luz láser digitalmente escaneada

- Se implementó el sistema de microscopía no-lineal de TPEF cuya excitación se basa en una hoja de luz láser digitalmente escaneada. El sistema puede trabajar con los regímenes lineal y no-lineal usando haces Gaussianos o Bessel. Su diseño permite pasar fácilmente de una modalidad a otra.

- Se caracterizaron las dimensiones de las líneas de luz de las modalidades disponibles en el sistema DSLM utilizando una solución de cumarina 540. Se graficaron los perfiles de intensidad de cada una de las líneas de luz en las direcciones x y y y se midieron sus respectivos anchos al valor FWHM. El campo de visión se determinó por la dimensión de la línea de luz en la dirección x (Δx) y se encontró que es mayor para haces Bessel y excitación lineal (DSLM-Bessel). En este caso se tiene que $\Delta x = 278\ \mu m$.

- Se determinaron las resoluciones lateral y axial de las diferentes modalidades utilizando microesferas fluorescentes de 0.5 μm de diámetro inmersas en una solución de 2 % de agar. Cabe mencionar que en un sistema DSLM la resolución lateral depende de las características ópticas del objetivo de colección, mientras que la resolución axial depende tanto del objetivo de colección como del ancho de la hoja de luz (Δy). Se encontró que las resoluciones laterales son similares para todas las modalidades y sus valores están en el rango de $\Delta r = 1.2 - 1.5\ \mu m$. Por otro lado, las modalidades que utilizan excitación no-lineal presentaron una mejor resolución axial ($\Delta z = 2.3$ y $\Delta z = 3.2\ \mu m$ para las modalidades 2p-DSLM Gauss y 2p-DSLM-Bessel, respectivamente).

- Para comparar directamente las características de las cuatros modalidades disponibles en el sistema DSLM se utilizó una muestra de varios *C. elegans* que expresan la proteína fluorescente cameleon en la faringe. Los gusanos se colocaron en el mismo plano y se alinearon a lo largo de la dirección de incidencia de la hoja de luz (x). Para cada modalidad se tomó un conjunto de imágenes con un paso de 2 μm en la dirección z, de esta manera fue posible hacer una imagen tridimensional de la faringe.

- Se obtuvo que la modalidad 2p-DSLM-Gauss proporciona una mejor calidad de imagen (en términos de un mayor contraste y un menor ruido de fondo) que la modalidad DSLM-Gauss. Sin embargo, su reducido campo de visión se vuelve una limitante en aplicaciones que requieran visualizar muestras grandes.

- La modalidad 2p-DSLM-Bessel fue la mejor ya que permitió obtener imágenes en un mayor campo de visión y con una buena resolución axial. En este sentido, es importante mencionar que para los haces Bessel el campo de visión se incrementó hasta cuatro veces, comparado con los haces Gaussianos, sin comprometer la resolución axial.

- En cuanto a eficiencia de fuorescencia, las modalidades que utilizaron excitación lineal resultaron ser mejores. Las potencias de excitación necesarias para obtener la misma señal de fluorescencia fueron menores a 1 mW en los casos lineales, y de unas docenas e incluso hasta cientos de mW para los casos no-lineales.

5.2 Respecto al monitoreo y escritura láser en compositos de nanopartículas de plata utilizando microscopía de generación de segundo armónico

- Se implementó y se caracterizó un sistema de microscopía no-lineal el cual puede utilizarse para estudios en el area de Biología y/o Materiales. Para el caso particular de

un objetivo de 10× y apertura numérica de 0.30 (objetivo utilizado en esta fase del trabajo) se tuvo una resolución lateral medida de 3.2 μm y una resolución axial calculada de 34 μm.

- Se escribieron patrones usando una energía por pulso de 1.6 nJ (potencia promedio de 150 mW). La escritura se realizó trasladando manualmente la muestra sobre el punto focal del láser moviendo la platina xy del microscopio. Cada línea fue escrita moviendo la platina del microscopio hacia adelante y hacia atrás (ida y vuelta) con una velocidad de alrededor de 4 mm/s. Los patrones escritos fueron evaluados mediante la adquisición de imágenes de GSA.

- La señal de GSA fue máxima cuando la polarización del láser se ajustó en la dirección $\hat{p}$, es decir, paralela a la dirección de la orientación de los ejes mayores de las NPs-Ag (eje x). Se tomaron imágenes de transmisión con el mismo microscopio utilizando la lámpara de halógeno que trae integrada y polarizando la luz de la misma. Cuando la imagen de transmisión se tomó con la luz polarizada en $\hat{s}$, tanto la zona dañada como el resto de la muestra no presentaron absorción de la luz y por lo tanto no se apreció el daño. Sin embargo, cuando se utilizó luz polarizada en la dirección $\hat{p}$ la zona dañada se volvió visible, esta transmisión en la zona de los canales escritos significa que no hay absorción plasmónica y pot lo tanto que una evidente modificación estructural ocurrió en el compuesto de NPs-Ag.

- Para fluencias menores a 2 mJ/cm^2 la señal se ajustó a una pendiente cuadrática la cual corresponde a un proceso óptico no-lineal de segundo orden (GSA) originado en el compuesto. Para fluencias entre 2 y 3.5 mJ/cm^2 la pendiente de la señal se incrementó indicando que otros procesos físicos empiezan a tomar lugar. Este cambio de pendiente

parece señalar el inicio de un proceso de daño a las nanopartículas. Para fluencias mayores a 3.5 mJ/cm^2 se observó un claro decaimiento de la señal y está asociado a una remoción considerable de NPs-Ag.

- Se mostró que independientemente de la fluencia depositada en el compuesto de NPs-Ag, la señal depende de la polarización del láser, siendo máxima cuando el haz del láser está polarizado en la dirección $\hat{p}$ (polarización paralela al eje mayor de las nanopartículas). Esto indica que el proceso de daño está relacionado con la absorción plasmónica de las NPs-Ag elongadas.

- Para una fluencia de irradiación de 2.2 mJ/cm^2 no se observó un decaimiento significativo de la señal después de cinco barridos, indicando que no se induce daño alguno en las NPs-Ag en el rango de 0.8 a 1.6 mm/s (1.3 a 0.6 $ms/\mu m$, respectivamente). Sin embargo, para una fluencia de 4.7 mJ/cm^2 y un tiempo de vuelo de 0.3 $ms/\mu m$ (3.3 mm/s), se pudo observar un decaimiento de la señal para los barridos posteriores indicando que ha ocurrido un cambio morfológico o bien una disolución de algunas nanopartículas. Para una fluencia de 11.7 mJ/cm^2 la señal ya no fue reproducible después del primer barrido, lo cual indica un evidente daño de las nanopartículas.

- Ya sea por un proceso térmico o un proceso de absorción multifotónica, es probable que el daño en las nanopartículas esté asociado a una redisolución de plata en la matriz de sílice, lo que resulta en la desaparición de las NPs-Ag. Esto se sustenta por el hecho de que la señal disminuyó considerablemente en las zonas irradiadas.

- La región en donde se implantaron las nanopartículas presenta un índice de refracción considerablemente mayor al de la sílice ($\Delta n \sim 10^{-2}$), de ahí que puede ser posible realizar un guiado de luz en la zona intermedia (no irradiada) entre ambos canales. Por

lo tanto, es evidente que con el sistema de microscopía no-lineal aquí implementado, es posible escribir y monitorear a la vez diferentes patrones de estructuras fotónicas (guías de canal y rejillas de Bragg, por ejemplo) en materiales nanoestructurados compuestos de nanopartículas metálicas, lo cual resulta complicado realizar con la técnica de implantación iónica utilizada en la fabricación de la muestra de NPs-Ag.

5.3 Propuestas para trabajo a futuro

Respecto a la primera fase de este trabajo de tesis que corresponde a la microscopía no-lineal de TPEF basada en una hoja de luz láser digitalmente escaneada, en el sistema DSLM implementado se puede acondicionar la cámara donde se colocan las muestras para tener un mejor control de ciertos factores físicos (temperatura, presión, etc.) que puedan afectar (o bien, ayudar) en el funcionamiento de las muestras biológicas vivas mientras son observadas, lo cual puede influir de cierta manera en la interpetración de los resultados obtenidos y/o esperados. Asimismo, también se puede adaptar dicho sistema para que sea multidireccional, es decir, que pueda tener la viabilidad de utilizar más de un sistema de detección a la vez.

Respecto a la segunda fase que corresponde al monitoreo y escritura láser en materiales nanoestructurados mediante microscopía de generación de segundo armónico, el trabajo inmediato que se debe realizar es mostrar que efectivamente los patrones escritos funcionen como una guía de onda, de ser el caso, se debe de realizar una caracterización completa del guiado (propagación de modos, eficiencia de acoplamiento, etc.). Respecto al sistema de microscopía no-lineal implementado, es conveniente adaptar un control automatizado (y sicronizado con la detección) en la dirección axial (eje z), para la toma de imágenes en 3D.

Publicaciones derivadas del trabajo de tesis

1. Omar E. Olarte, **Jacob Licea-Rodriguez**, Jonathan A. Palero, Emilio J. Gualda, David Artigas, Jurgen Mayer, Jim Swoger, James Sharpe, Israel Rocha-Mendoza, Raul Rangel-Rojo and Pablo Loza-Alvarez, *"Image formation by linear and nonlinear digital scanned light-sheet fluorescence microscopy with Gaussian and Bessel beam profiles"*, Bio. Opt. Express **3:7**, 1492-1505 (2012).

2. **Jacob Licea-Rodríguez**, Israel Rocha-Mendoza, Raúl Rangel-Rojo, Luis Rodríguez-Fernández and Alicia Oliver, *"Femtosecond laser writing over silver nanoparticles system embedded in silica using nonlinear microscopy"*, Opt. Mater. **36:3**, 682-686 (2014).

Referencias bibliográficas

Akturk, S., Zhou, B., Pasquiou, B., Franco, M., y Mysyrowicz, A. (2008). Intensity distribution around the focal regions of real axicons. *opt. Commun*, **281**(17): 4240–4244.

Bachelier, G., Butet, J., Russier-Antoine, I., Jonin, C., Benichou, E., y Brevet, P. F. (2010). Origin of optical secondharmonic generation in spherical gold nanoparticles: Local surface and nonlocal bulk contributions. *Phys. Rev. B*, **82**(23): 235403.

Bohren, C. F. y Huffman, D. R. (1983). *Absorption and Scattering of Light by Small particles*. Wiley, New York. 530 pp.

Born, M. y Wolf, E. (1993). *Principles of Optics*. Pergamon Press, Oxford. 790 pp.

Boyd, R. W. (2008). *Nonlinear Optics*. Academic Press, New York. 613 pp.

Brzobohatý, O., Čižmár, T., y Zemánek, P. (2008). High quality quasi-bessel beam generated by round-tip axicon. *Opt. Express*, **16**(17): 12688–12700.

Buist, A. H., Muller, M., Squier, J., y Brakenhoff, G. J. (1998). Real time two-photon absorption microscopy using multi point excitation. *Journal of Microscopy*, **192**(2): 217–226.

Campagnola, P. J. y Loew, L. M. (2003). Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cell, tissues and organisms. *Nature biotechnology*, **21**(11): 1356–1360.

Campagnola, P. J., Millard, A. C., Terasaki, M., Hoppe, P. E., Malone, C. J., y Mohler, W. A. (2002). Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophysical Journal*, **81**(1): 493–508.

Crespo-Sosa, A., Schaaf, P., Reyes-Esqueda, J. A., Seman-Harutinian, J. A., y Oliver, A. (2007). Excimer laser absorption by metallic nano-particles embedded in silica. *J.Phys. D: Appl. Phys.*, **40**(7): 1890–1895.

Diaspro, A. (2001). *Building a two-photon microscope using a laser scanning confocal architecture*. Oxford University Press, New York. 179 pp.

Diaspro, A., Chirico, G., y Collin, M. (2005). Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **38**(2): 97–166.

Drummond, D. R., Carter, N., y Cross, R. A. (2002). Multiphoton versus confocal high resolution z-sectioning of enhanced green fluorescent microtubules: increased multiphoton photobleaching within the focal plan can be compensate using pockels cell and dual widefield detectors. *Journal of Microscopy*, **206**(2): 161–169.

Ducuing, J. y Bloembergen, N. (1964). Statistical fluctuations in nonlinear optical processes. *Physical Review*, **133**(6): 1493–1502.

Eaton, S. M., Zhang, H., Ng, M. L., Li, J., Chen, W. J., Ho, S., y Herman, P. R. (2008). Transition from thermal diffusion to heat accumulation in high repetition rate femtosecond laser writing of buried optical waveguides. *Opt. Express*, **16**(13): 9443–9458.

Engelbrecht, C. J. y Stelzer, E. H. (2006). Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope (spim). *Opt. Lett*, **31**(10): 1477–1479.

Fahrbach, F. O., Simon, P., y Rohrbach, A. (2010). Microscopy with self-reconstructing beams. *Nat. Photonics*, **4**(11): 780–785.

Fernández-Hernández, R., Gleason-Villagran, R., Torres-Torres, C., Rodriguez-Fernandez, L., Crespo-Sosa, A., Cheang-Wong, J. C., López-Suárez, A., Rangel-Rojo, R., Oliver, A., y Reyes-Esqueda, J. A. (2012). On the physical contributions to the third-order nonlinear optical response in plasmonic nanocomposites. *Journal of Optics*, **14**(12): 125203.

Fuentes, C. G. (2013). *Construcción de un microscopio no lineal basado en la generación de segundo armónico para el estudio de la fibrogénesis* in vitro *del colágeno*. Tesis de doctorado, CICESE, Ensenada, B.C.

Gattass, R. R. y Mazur, E. (2008). Femtosecond laser micromachining in transparent materials. *Nat. Photon.*, **2**(4): 219–225.

Girking, J. M. (2003). Optical physics enables advances in multiphoton imaging. *Journal of Physics D.*, **36**(14): R250–R258.

Göppert-Mayer, M. (1931). Uber elementarakte mit zwei quantensprüngen. *Annalen der Physik*, **401**(3): 273–294.

Greger, K., Swoger, J., y Stelzer, E. H. K. (2007). Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope. *Rev. Sci. Instrum*, **78**(2): 023705.

Helmchen, F. y Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods.*, **2**(12): 932–940.

Hilderbrand, S. A. (2010). *Labels and probes for live cell imaging:Overview and selection guide*. Humana Press, New York. 17-45 pp.

Hop, A. y Nether, E. (2001). Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, **80**(4): 2029–2036.

Huisken, J. y Stainier, D. Y. R. (2009). Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*, **136**(12): 1963–1975.

Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J., y Stelzer, E. H. K. (2004). Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, **305**(5686): 1007–1009.

Kaiser, W. y Garrett, C. G. B. (1961). Two-photon excitation in $caf_2 : eu^{2+}$. *Phys. Rev. Lett*, **7**(6): 229–231.

Keller, P. J., Schmidt, A. D., Wittbrodt, J., y Stelzer, E. H. K. (2008). Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science*, **322**(5904): 1065–1069.

Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsien, R. Y., y Schafer, W. R. (2000). Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of c. elegans. *Neuron*, **26**(3): 583–594.

Khlebtsov, N. G. (2008). Optics and biophotonics of nanoparticles with a plasmon resonance. *Quantum Electronics*, **38**(6): 504–529.

Kofman, R., Cheyssac, P., Aouaj, A., Lereah, Y., Deutscher, G., Ben-David, T., Penisson, J. M., y Bourret, A. (1994). Surface melting enhanced by curvature effects. *Surf. Sci.*, **303**(1): 231–246.

König, K., So, P. T. C., Mantulin, W. W., y Gratton, E. (1997). Cellular response to near-infrared femtosecond laser pulses in two-photon microscopes. *Opt. Lett.*, **22**(2): 135–136.

Köning, K. (2000). Multiphoton microscopy in life sciences. *Journal of Microscopy*, **200**(2): 83–104.

Lakowicz, J. R. (2007). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, New York. 923 pp.

Louisell, W. H. (1973). *Quantum Statistical Properties of Radiation*. Wiley, New York. 528 pp.

Maier, S. (2007). *Plasmonics:fundamentals and applications*. Springer, New York. 212 pp.

Manoj, M., Santos, S. I. C. O., Zalvidea, D., y Loza-Alvarez, P. (2009). Multimodal optical workstation for simultaneous linear, nonlinear microscopy and nanomanipulation: Upgrading a commercial confocal inverted microscope. *Review of Scientific Instruments*, **80**(7): 073701.

Masuda, M., Sugioka, K., Cheng, Y., Aoki, N., Kawachi, M., Toyoda, K., Helvajian, H., y Midorikawa, K. (2003). 3-d microstructuring inside photosensitive glass by femtosecond laser excitation. *Appl. Phys. A.*, **76**(5): 857–860.

Matsui, I. (2005). Nanoparticles for electronic device applications: A brief review. *JCEJ*, **38**(8): 535–546.

Muller, M., Scmidt, J., Mironov, S. L., y Richter, D. W. (2003). Construction and performance of a custom-built two-photon laser scanning system. *Journal of Physics D:Applied Physics*, **36**(14): 1747.

Nappa, J., Revillod, G., Russier-Antoine, I., Benichou, E., Jonin, C., y BrevetKhlebtsov, P. F. (2005). Electric dipole origin of the second harmonic generation of small metallic particles. *Phys. Rev. B*, **71**(1): 165407.

Oliver, A., Reyes-Esqueda, J. A., Cheang-Wong, J. C., Román-Velázquez, C. E., Crespo-Sosa, A., Rodríguez-Fernández, L., Seman, J. A., y Noguez, C. (2006). Controlled anisotropic deformation of ag nanoparticles by si ion irradiation. *Phys. Rev. B.*, **74**(24): 245425.

Ordal, M. A., Long, L. L., Bell, R. J., Bell, S. E., Bell, R. R., Alexander, R. W., y Ward, C. A. (1983). Optical properties of the metals al, co, cu, au, fe, pb, ni, pd, pt, ag, ti, and w in the infrared and far infrared. *Applied Optics*, **22**(7): 1099–1119.

Palero, J., Santos, S. I. C. O., Artigas, D., y Loza-Alvarez, P. (2010). A simple scanless two-photon fluorescence microscope using selective plane illumination. *Opt. Express*, **18**(8): 8491–8498.

Patterson, G. H. y Piston, D. W. (2000). Photobleaching in two-photon excitation. *Biophysical Journal*, **78**(4): 2159–2162.

Pawley, J. B. (2006). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, New York. 680-689 pp.

Planchon, T. A., Gao, L., Milkie, D. E., Davidson, M. W., Galbraith, J. A., Galbraith, C. G., y Betzig, E. (2011). Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using bessel beam plane illumination. *Nat. Methods*, **8**(5): 417–423.

Psilodimitrakopoulos, S., Santos, S. I. C. O., Amat-Roldan, I., Thayil, A. K. N., Artigas, D., y Loza-Alvarez, P. (2009). *In vivo*, pixel-resolution mapping of thick filaments orientation in nonfibrilar muscle using polarization-sensitive second harmonic generation microscopy. *J.Biomed. Opt.*, **14**(1): 014001.

Rangel-Rojo, R. (2001). *Notas del curso de Óptica Electromagnética*. CICESE, Ensenada, B. C. 68 pp.

Rangel-Rojo, R., McCarthy, J., Bookey, H. T., Kar, A. K., Rodriguez-Fernandez, L., Cheang-Wong, J. C., Crespo-Sosa, A., Lopez-Suarez, A., Oliver, A., Rodriguez-Iglesias, V., y Silva-Pereyra, H. G. (2009). Anisotropy in the nonlinear absorption of elongated silver nanoparticles in silica, probed by femtosecond pulses. *Opt. Commun.*, **282**(9): 1909–1912.

Reiser, K. M., Bratton, C., Yankelevich, D. R., Knoesen, A., Rocha-Mendoza, I., y Lotz, J. (2007). Quantitative analysis of structural disorder in intervertebral disks using second harmonic generation imaging: Comparison with morphometric analysis. *Biomedical Optics*, **12**(6): 064019–064019.

Reynaud, E. G., Kržič, U., Greger, K., y Stelzer, E. H. K. (2008). Light sheet-based fluorescence microscopy: more dimensions, more photons, and less photodamage. *HFSP J.*, **2**(5): 266–275.

Ridsdale, A., Micu, I., y Stys, P. (2004). Conversion of the nikon c1 confocal laser-scanning head for multiphoton excitation on an upright microscope. *Applied Optics*, **43**(8): 1669–1675.

Robles Agudo, M. (2005). *Generación simultánea del segundo y tercer armónicos mediante cuasi-empatamiento de fases*. Tesis de doctorado, CICESE, Ensenada, B.C.

Rocha-Mendoza, I., Yankelevich, D. R., Wang, M., Reiser, K. M., Frank, C. W., y Knoesen, A. (2007). Sum frequency vibrational spectroscopy: The molecular origins of the optical second-order nonlinearity of collagen. *Biophysical Journal*, **93**(12): 4433–4444.

Rocha-Mendoza, I., Rangel-Rojo, R., Rodriguez-Fernandez, L., y Oliver, A. (2011). Second-order nonlinear response of composites containing aligned elongated silver nanoparticles. *Optics Express*, **19**(22): 21575–21587.

Sheppard, C. J. R. (1989). Axial resolution of confocal fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, **154**(3): 237–241.

So, P. T. C., Dong, C. Y., Masters, B. R., y Berland, K. M. (2000). Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2**(1): 399–429.

Tan, Y. P., Liano, I., Hopt, A., Wurriehausen, F., y Neher, E. (1999). Fast scanning and efficient photodetection in a simple two-photon microscope. *Journal of Neuroscience Methods*, **92**(1): 123–135.

Thomson, R. R., Campbell, S., Blewett, I. J., Kar, A. K., y Reid, D. T. (2006). Optical waveguide fabrication in z-cut lithium niobate (linbo3) using femtosecond pulses in the low repetition rate regime. *Appl. Phys. Lett.*, **88**(11): 111109.

Truong, T. V., Supatto, W., Koos, D. S., Choi, J. M., y Fraser, S. E. (2011). Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy. *Nat. Methods*, **8**(9): 757–760.

Tyrell, R. M. y Keyse, S. M. (1990). The interaction of uva radiation with cultured cell. *J. Photochem. Photobiol*, **4**(4): 349–361.

Vilayurganapathy, S., Devaraj, A., Colby, R., Pandey, A., Varga, T., Shutthanandan, V., Manandhar, S., El-Khoury, P. Z., Kayani, A., Hess, W. P., y Theyuthasan, S. (2013). Subsurface synthesis and characterization of ag nanoparticles embedded in mgo. *Nanotechnology*, **24**(9): 095707.

Voisin, C., del Fatti, N., Christofilos, D., y Vallée, F. (2001). Ultrafast electron dynamics and optical nonlinearities in metal nanoparticles. *J.Phys. Chem. B.*, **105**(12): 2264–2280.

Williams, R. M., Zipfel, W. R., y Webb, W. W. (2001). Multiphoton microscopy in biological research. *Chemical Biology*, **5**(5): 603–608.

Zipfel, W. R., Williams, R. M., y Webb, W. W. (2003). Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotech.*, **21**(11): 1369–1377.