



DESARROLLO DE UN SISTEMA COMBINADO DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y MICROSCOPIA DE FUERZAS

ELENA LÓPEZ ELVIRA

TESIS DOCTORAL

Propuesta para optar al grado de
Doctor en Física por la Universidad de Murcia

Directores:

Dr. Arturo M. Baró Vidal

Dep. de Superficies y recubrimientos del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Dr. Jaime Colchero

Dep. de Física de la Materia Condensada del Centro de Investigaciones Ópticas y Nanofísicas
Universidad de Murcia

A mi pequeña pero gran Familia

En algún sitio algo increíble espera ser descubierto

Carl Sagan

DESARROLLO DE UN SISTEMA COMBINADO DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y MICROSCOPIA DE FUERZAS

Índice	7
Capítulo 1. Introducción	11
1.1 Evolución histórica: del microscopio óptico al microscopio de fuerzas	12
1.2 Combinación de microscopía de campo cercano y microscopía óptica (SFM-MO)	17
1.2.1 Estado del arte de la combinación de SFM-MO	19
1.3 Motivación y objetivo de esta tesis	20
1.4 Estructura de la memoria de tesis	23
1.5 Referencias	23
Capítulo 2. Técnicas experimentales	27
2.1 Microscopía óptica	27
2.1.1 Fundamentos básicos	27
2.1.2 Descripción y componentes	29
2.1.3 Apertura numérica y límite de resolución	31
2.1.4 Propiedades del microscopio	33
2.1.5 Técnicas ópticas de medida	34
2.2 Microscopía de Fuerzas	37
2.2.1 Fundamentos básicos	37
2.2.2 Componentes básicos del microscopio de fuerzas	38
2.2.3 Modos de medida	42
2.2.4 ESFM-KPM	44
2.3 Referencias	46

Capítulo 3. Diseño y desarrollo del SFM combinado con microscopía óptica	49
3.1 El microscopio ideal	
3.1.1. Criterios generales del SFM “ideal” para el diseño	49
3.1.2. Criterios específicos para el diseño del SFM “ideal”	52
3.1.3 Criterios del sistema de barrido para el diseño	56
3.2 Diseño del primer prototipo: SFM-1	58
3.2.1 Mesa XY	59
3.2.2 Mesa Z	62
3.2.3 Sistema de detección	63
3.3 Puesta a punto: Resultados y medidas	65
3.3.1 Calibración del sistema de barrido	66
3.3.2 Medidas en diferentes modos y diferentes ambientes	67
3.3.3 Medidas combinadas	70
3.3.4 Medidas KPM combinadas con microscopía óptica	73
3.4 Referencias	80

Capítulo 4. Mejoras en el diseño y desarrollo del SFM combinado con microscopía óptica	81
4.1 Mejoras del SFM-2	82
4.2 Diseño del SFM-2	87
4.2.1 Mesa XY	88
4.2.2 Mesa Z	92
4.2.3 Sistema de detección	93
4.3 Resultados y medidas	96
4.4 Sistema de barrido z que actúa sobre la punta del SFM	102
4.4.1 Fundamento teórico	102
4.4.2 Desarrollo instrumental	103
4.4.3 Resultados	104
4.4.4 Medidas con dos sistemas piezoeléctricos en z	110
4.5 Referencias	114

Capítulo 5. Fotodegradación de polímeros solares	117
5.1 Motivación y objetivos	117
5.2 Introducción	118
5.3 Métodos experimentales	121
5.3.1 Preparación de la muestra	121
5.3.2 El sistema combinado: SFM + luz	121
5.3.3 Espectroscopía Raman	123
5.4 Resultados	124
5.4.1 Estudio de SFM y KPM	124
5.4.2 Estudio de espectroscopia Raman	133
5.5 Conclusiones	136
5.6 Referencias	138
Conclusiones	143
Mejoras en curso y retos futuros	145
Publicaciones	147
Abreviaturas	149
Agradecimientos	151
Galería de “nanoarte”	155

Capítulo 1. Introducción

Desde tiempos ancestrales el hombre ha observado el mundo que le rodea intentando dar explicación a los sucesos que ocurren a su alrededor. De esta forma la observación es el punto de partida de toda investigación. La principal fuente de información la recibimos por el sentido de la vista y así nuestra visión está adaptada y optimizada según las necesidades que evolutivamente nos han sido útiles para la supervivencia. El límite físico de nuestra visión no nos permite observar objetos de tamaños inferiores a 0,1 mm ni formar imágenes fuera del rango de la radiación visible que va desde los 400 a los 750 nm. La curiosidad del ser humano por poder observar más allá de sus límites visuales le ha llevado al desarrollo de técnicas instrumentales que le ha permitido superar dichos límites físicos para poder observar objetos muy pequeños, así como objetos muy lejanos e incluso ver el mundo con radiaciones fuera del rango visible.

La mayor parte de estos avances tecnológicos han sido motivados por las principales preocupaciones del hombre. Dentro de estas motivaciones cabe resaltar las ciencias de la salud que le permiten vivir más y mejor. Con esta finalidad el hombre se ha interesado en la observación y estudio de los elementos constitutivos de nuestro organismo como los tejidos, las células (neuronas, glóbulos rojos y blancos, plaquetas...) o la propia estructura celular (núcleo, mitocondria, liposoma...), así como de microorganismos invisibles a simple vista, que influyen significativamente en su vida por ser causantes de enfermedades (virus, bacterias, hongos...). Gracias a los avances de la microscopía, el hombre ha sido capaz de realizar importantes descubrimientos en el campo de la medicina y la microbiología que le han permitido mejorar su esperanza y calidad de vida.

También merece una mención especial la ciencia de materiales como un campo que ha permitido el desarrollo y la evolución de la especie humana. Tan importantes son los avances que se han producido en la sociedad por el descubrimiento y la aplicación de materiales a lo largo de la historia, que hoy en día algunos periodos históricos se designa con el nombre de dicho material. Así ocurre desde la Edad de Piedra hasta la Edad del Hierro, pasando por la Edad de Cobre y la Edad de Bronce.

Gracias al desarrollo de este campo de investigación hoy en día son innumerables los distintos tipos de materiales que nos rodean, desde aleaciones

metálicas, cerámicas, plásticos, vidrios, composites, etc. Todos estos materiales abarcan campos de aplicación que van desde la ingeniería y la arquitectura, con la construcción de viviendas y carreteras que nos permiten cobijarnos y desplazarnos cómodamente, hasta la generación de utensilios de consumo así como de dispositivos con aplicaciones en telecomunicaciones, informática y electrónica entre otros, que nos permiten satisfacer nuestras necesidades actuales.

Hoy en día gracias a los desarrollos en las técnicas de medida tanto micro como nanométricas se abre un campo de investigación que interrelaciona y combina estas dos disciplinas de gran importancia para el ser humano, como son las ciencias de la salud y de materiales. Este campo de estudio es el de los biomateriales. Los materiales biocompatibles pueden incorporarse a un sistema vivo con el fin de sustituir o regenerar tejidos. También existen materiales y dispositivos con función farmacológica que actúan en el organismo.

1.1 Evolución histórica: del microscopio óptico al microscopio de fuerzas

Ya en las antiguas civilizaciones se conocía el poder amplificador de las lentes biconvexas. En excavaciones arqueológicas en la antigua Mesopotamia se encontraron en 1928 lentes planas, convexas y biconvexas fabricadas entre el 2000 y el 3000 a.C. Hallazgos semejantes han tenido lugar en Grecia y China.

Sin embargo, no es hasta finales del siglo XVI, con el desarrollo del microscopio, cuando se producen los avances tecnológicos que permitirían acceder al universo de lo invisible. A partir de ese momento se inicia la exploración de la rica y compleja vida que existe más allá de lo apreciable a simple vista.

Entre 1590 y 1608 Zacarías Jansen, Hans Jansen y Hans Lippershey construyen en Holanda el primer microscopio compuesto. Éste estaba formado por dos tubos concéntricos deslizantes con una lente en cada extremo que conseguía aumentar el tamaño del objeto casi 10 veces (Figura 1.1(a)).

En 1609 Galileo Galileo desarrolla en Italia un microscopio compuesto similar al de los holandeses (Figura 1.1(b)).

En 1624 Jean Faber acuña el término microscopio, que proviene etimológicamente del griego *micro* (pequeño) y *scopeo* (observar).

En 1663 Robert Hook observó por primera vez lo que él mismo denominó células en muestras de musgo y en delgadas secciones de corcho. En su libro *Micrographia* de 1665 aparecen publicados dibujos detallados de sus observaciones de insectos, semillas, hojas, plumas, etc.

El holandés Anton van Leeuwenhoek desarrolla el primer microscopio simple a finales del siglo XVII. Éste estaba formado por una pequeña lente convexa (de menos de 1mm de diámetro) montada sobre una plancha, con un dispositivo que permitía sujetar la muestra (Figura 1.1(c)). Logró fabricar lentes con un aumento de 275 veces. Con este microscopio pudo observar entre otros microorganismos glóbulos rojos, bacterias, hongos y protozoos.

Con el trabajo de Hooke empleando un microscopio compuesto y especialmente con el de Leewenhoek empleando un microscopio simple, se inicia la investigación en el mundo microscópico, se da a conocer la gran complejidad de diminutos organismos vivos y se realizan grandes avances en microbiología.

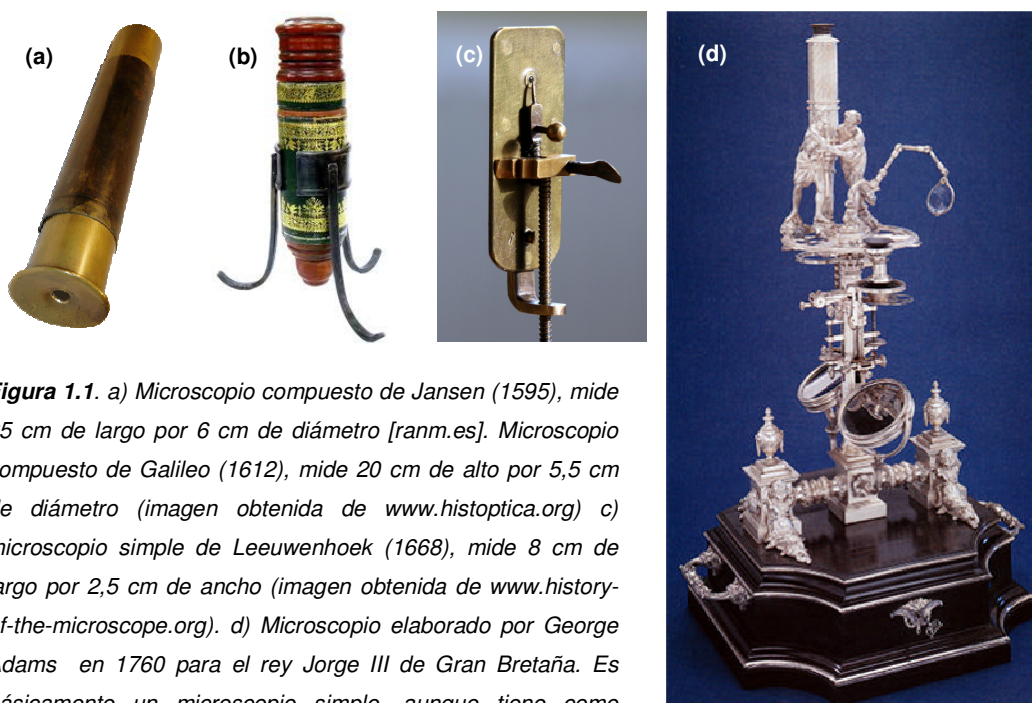


Figura 1.1. a) Microscopio compuesto de Jansen (1595), mide 25 cm de largo por 6 cm de diámetro [ranm.es]. Microscopio compuesto de Galileo (1612), mide 20 cm de alto por 5,5 cm de diámetro (imagen obtenida de www.histoptica.org) c) microscopio simple de Leeuwenhoek (1668), mide 8 cm de largo por 2,5 cm de ancho (imagen obtenida de www.history-of-the-microscope.org). d) Microscopio elaborado por George Adams en 1760 para el rey Jorge III de Gran Bretaña. Es básicamente un microscopio simple, aunque tiene como accesorio un microscopio compuesto [Ford02].

En esta época el principal inconveniente que presentaba el microscopio compuesto, era que a la vez que aumentaba la imagen aumentaba las aberraciones producidas por las lentes, de forma que el microscopio simple fue de gran importancia en los inicios de la microscopía, ya que al verse menos afectado por las aberraciones producía imágenes de mayor claridad que el microscopio compuesto. Sin embargo su uso se vio relegado por su difícil ajuste y lo tedioso de su manejo [Ford2002].

Desde entonces, la evolución del microscopio compuesto centra sus esfuerzos en corregir las aberraciones producidas por las lentes, o lo que es lo mismo, los defectos en la imagen que tienen lugar al atravesar la luz un sistema óptico. Durante el siglo XVIII se emplearon lentes acromáticas, esto es, que corrigen la aberración cromática y se introdujeron en los equipos mejoras mecánicas que aumentaron su estabilidad y facilidad de manejo.

El cirujano escocés Robert Brown, en 1828, utilizando un microscopio simple, identificó y nombró el núcleo de las células y observó el movimiento al azar de las pequeñas partículas suspendidas en líquidos debido a la agitación térmica, lo que hoy conocemos como movimiento browniano.

En 1873 los estudios realizados por el físico alemán Ernst Abbe impulsan la óptica teórica y práctica al determinar que el límite de resolución de un microscopio depende de la longitud de onda de la luz con la que se ilumina el espécimen, de la apertura angular de la lente y del índice de refracción del medio en que se encuentra inmersa dicha lente. Sustituyendo el agua por aceite de cedro (de mayor índice de refracción) aporta una mejora a la microscopía de inmersión.

En 1897, J.J. Thompson descubre partículas cargadas negativamente, denominadas posteriormente electrones. En 1906 recibió el Premio Nobel de Física.

En 1924 De Broglie comprueba el carácter ondulatorio de los electrones, así como que poseen una longitud de onda que depende de su energía. De esta forma consigue generar longitudes de onda 10000 veces más pequeñas que la longitud de onda de la luz visible. Obtuvo el Premio Nobel de Física en 1929.

En el año 1926 Busch demuestra que es posible enfocar un haz de electrones con una lente electromagnética y que los sistemas electrónicos obedecen las leyes de la óptica.

Los descubrimientos hechos desde los trabajos de Abbe hasta Busch culminan en 1931 con el desarrollo del microscopio electrónico de transmisión (TEM, del inglés *Transmisión Electron Microscope*) por los alemanes Ernst Ruska y Max Knoll basándose en aumentar el poder de resolución empleando radiación de menor longitud de onda (de 0.05 nm a 10 nm) que la visible (de 400 a 750 nm). En este caso se emplean electrones para iluminar la muestra y las lentes ópticas se sustituyen por lentes electromagnéticas, pudiéndose llegar a alcanzar una resolución de 0,1 nm y aumentos de 100.000x. La invención del TEM le valió a Ruska el Premio Nobel de Física en 1986.

En 1942 se desarrolla el microscopio electrónico de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscope*). Este microscopio forma una imagen de la muestra haciendo incidir un haz de electrones sobre ella. Detectando la interacción entre el haz de electrones y los electrones de la muestra se obtiene información sobre la topografía y composición de esta última. Con el TEM se obtienen mayor resolución que con el SEM pero las muestras deben ser cortes finos, mientras que en el SEM las muestras pueden tener cualquier grosor aunque deben ser conductoras, por lo que en algunos casos es necesario metalizarlas.

El físico holandés Frits Zernike recibió el premio Nobel en 1953 por la invención del microscopio óptico de contraste de fases. Aunque podía parecer que la microscopía óptica había llegado a su límite, esto no es así debido al desarrollo de nuevos modos de operación de gran interés y a su aplicación a especímenes vivos que no se pueden estudiar con microscopía electrónica. Hoy en día continúan los desarrollos de técnicas de medida en microscopía óptica que superan el límite de difracción impuesto por la teoría de Abbe.

En los años 80 se desarrolla una nueva microscopía con resolución atómica que no está limitada por difracción, es la microscopía de campo cercano o de sonda local, SPM (*Scanning Probe Microscopy*). Se la denomina de campo cercano, debido a que la interacción entre punta y muestra decae rápidamente con la distancia y por ello ambas deben estar muy próximas (en el rango de los nanómetros). Esta nueva microscopía a diferencia de las anteriores permite obtener mayores resoluciones al no estar limitada por difracción, conviene destacar que su funcionamiento no se basa en las propiedades ondulatorias de las partículas que interactúan con la muestra, por lo que no se aplica la teoría de Abbe.

El primero de éstos microscopios de campo cercano es el microscopio de efecto túnel STM (*Scanning Tunneling Microscope*) desarrollado en 1981 por Gerd Binnig y Heinrich Rohrer. Gracias a este invento, que permite explorar el mundo nanométrico, les fue otorgado el Premio Nobel de Física en 1986 [Binnig82]. Este microscopio, basado en el fenómeno cuántico que permite a una partícula atravesar una barrera de potencial mayor que su propia energía cinética, mide la corriente túnel entre una fina y afilada punta y la muestra. Así permite obtener con gran resolución un mapa de densidades electrónicas, de manera que se pueden distinguir unos átomos de otros [Sugimoto2007].

En 1986 los creadores del STM desarrollan el microscopio de fuerzas SFM (*Scanning Force Microscope*) también llamado microscopio de fuerzas atómicas AFM (*Atomic Force Microscope*) [Binnig86]. En este caso la punta afilada se sitúa en el extremo de una micropalanca, de forma que al acercarse a la muestra, permite detectar las fuerzas de interacción entre ambas. Gracias a este principio de funcionamiento, el SFM es una herramienta mucho más versátil que su predecesor el STM. Puesto que siempre hay fuerzas de interacción entre dos objetos, el SFM puede medir cualquier tipo de muestra, a diferencia del STM que se limita a muestras conductoras o semiconductoras. Además el SFM permite medir tanto al aire, como en vacío o en medio líquido, mientras que el STM ha demostrado ser una herramienta útil generalmente solo en condiciones de ultra alto vacío. Existen diversas variantes del microscopio de fuerzas en función de la interacción que detectan. La microscopía electrostática de campo cercano ESFM (*Electrostatic Scanning Force Microscopy*) que mide la interacción electrostática entre la punta y la muestra, la microscopía Kelvin KPM (*Kelvin Probe Microscopy*) mide el potencial superficial, la microscopía de fuerzas magnéticas MFM (*Magnetic Force Microscopy*) detecta la interacción magnética o el microscopio óptico de campo cercano SNOM (*Scanning Near-field Optical Microscopy*) mide la luz evanescente reflejada o transmitida por la muestra. De esta forma el SFM permite obtener no solo la topografía de la muestra sino también propiedades mecánicas, eléctricas, magnéticas o químicas entre otras.

Desde la invención de este tipo de microscopios, su evolución y desarrollo ha progresado muchísimo y ha contribuido enormemente al campo de la nanociencia y nanotecnología. Esto se debe a los avances que se producen día a día en este campo de investigación, éstos van desde la fabricación de puntas optimizadas para una determinada aplicación, hasta el desarrollo de nuevas técnicas de medida. Todo este esfuerzo está motivado por la obtención de una mayor resolución y la exploración de lo

“invisible” hasta el momento con las técnicas actuales, tal y como ha ocurrido desde el origen de la microscopía hace ya más de 400 años.

1.2 Combinación de microscopía de campo cercano y microscopía óptica (SFM-MO)

Como hemos comprobado en la sección anterior, las distintas microscopías focalizan sus esfuerzos para alcanzar un objetivo común, que es obtener imágenes con la mejor resolución en el menor tiempo posible. La microscopía óptica permite formar una imagen de la muestra a través del ocular en tiempo real o en una pantalla mediante un sistema de detección con la velocidad de adquisición de dicho sistema (en el rango del ms) mientras que la microscopía de campo cercano debe realizar un barrido de la muestra para adquirir las imágenes, lo cual, dependiendo del modo de medida, del tamaño y resolución de la imagen, puede tardar desde pocos segundos a varios minutos o incluso horas. Sin embargo, el desarrollo de sistemas de posicionamiento de gran barrido y resolución subnanométrica, como los materiales piezoeléctricos, está permitiendo a la microscopía de campo cercano obtener gran cantidad de información de la muestra en cada vez más área y menos tiempo. Actualmente, con sistemas de campo cercano de elevada velocidad se pueden adquirir hasta 25 imágenes por segundos (40 ms/imagen) [Ando2012].

Por otro lado, la microscopía óptica centra sus esfuerzos en conseguir superar el límite de difracción para obtener mejor resolución. Durante el siglo XX, se han desarrollado numerosas técnicas ópticas que sobrepasan el límite de resolución teórico marcado por Abbe permitiendo la observación de moléculas individuales [Coltharp2012]. Con la microscopía **confocal** se pueden formar imágenes en 3 dimensiones, por medio de la superposición de cortes finos de la muestra. Con microscopía **TIRF** (*Total Internal Reflection Fluorescence*) se puede conseguir mejor resolución debido a la iluminación en una fina sección de la muestra. Los estudios con **FRET** (*Föster Resonance Energy Transfer*) permiten conocer la funcionalidad de las biopartículas, además de su estructura [Baró-libro]. La microscopía **4pi** mejora la resolución al iluminar y detectar por ambos lados de manera coherente con un ángulo sólido máximo por medio de dos objetivos focalizados en la misma zona de la muestra en posiciones enfrentadas. La iluminación estructurada **SIM** (*Structured Illumination Microscopy*) consiste en iluminar la muestra con múltiples rayos de luz, ésta causa una

interferencia que permite visualizar mejor la estructura y obtener detalles específicos que normalmente son invisibles. La microscopía **STED** (*Stimulated Emission Depletion*) utiliza dos láseres pulsados, uno excita los fluoróforos a su estado fluorescente y el otro des-excita los fluoróforos de alrededor para que los centrales que permanecen iluminados se vean con mejor resolución.

Debido a estos grandes avances en la resolución óptica conseguidos con las técnicas de súper-resolución mencionadas y muchas otras se pueden llegar a observar objetos de pocos nanómetros, lo que acerca el rango de medida de la microscopía óptica al rango de la microscopía de campo cercano y por tanto facilita el empleo simultáneo de ambas técnicas.

En la figura 1.2 se muestra un esquema donde se puede ver el rango de funcionamiento de cada tipo de microscopía y la resolución que alcanza.

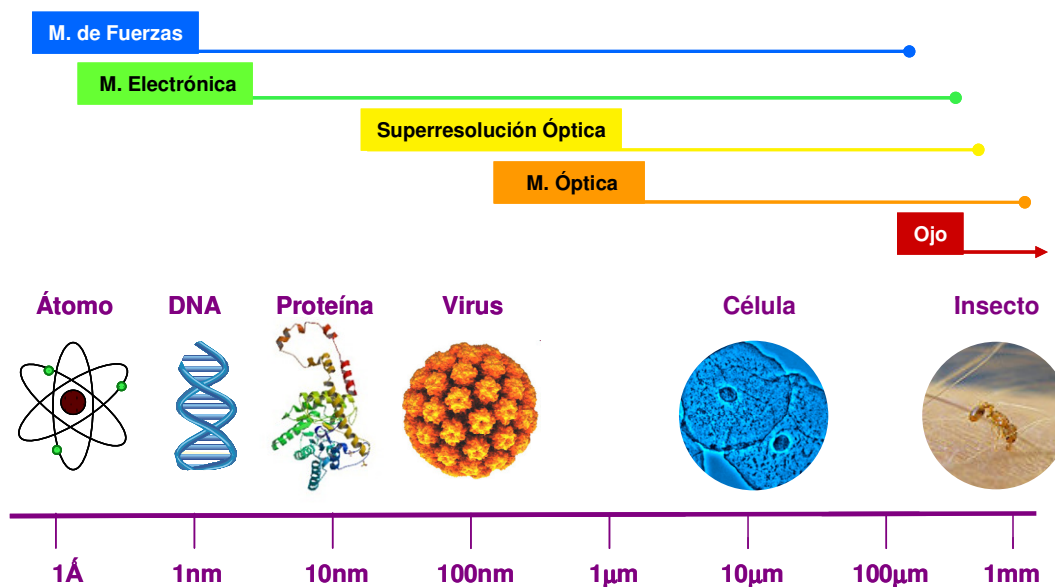


Figura 1.2. En este dibujo se muestra una comparativa entre las distintas microscopías. En la parte inferior aparece la escala de tamaños a la que corresponden las diferentes muestras representadas. En la parte superior aparecen los nombres de las diferentes microscopías y el ojo humano. La posición de la que parte el nombre muestra, en la escala de tamaños, el límite de resolución que alcanza dicha microscopía.

Por un lado el SFM tiene un rango de trabajo que va desde pocos nanómetros hasta 150 μm en nuestro caso. Mientras que la microscopía óptica clásica va desde el límite impuesto por difracción que es de unos 200 nm aproximadamente o $\lambda/2$ hasta

varios milímetros en función de la apertura numérica y del campo de trabajo del objetivo empleado. Si se utilizan técnicas de superresolución, se puede superar el límite de difracción y alcanzar resoluciones de varias decenas de nanómetros.

1.2.1 Estado del arte de la combinación de SFM-MO

Al comienzo de esta tesis, era posible adquirir algunos equipos comerciales que combinaban microscopía de fuerzas (SFM) con técnicas ópticas (fluorescencia, espectroscopía Raman, etc). Sin embargo, en ese momento los sistemas disponibles estaban focalizados principalmente a aplicaciones biológicas y su utilización en otro tipo de aplicaciones como la ciencia de materiales estaba muy limitada. Durante el desarrollo de este trabajo, los microscopios comerciales han evolucionado en paralelo y en la actualidad presentan mayor cantidad de accesorios opcionales que brindan más funcionalidad al sistema. Por eso es posible encontrar sistemas versátiles y completos que cubren casi todos los requerimientos necesarios para multitud de aplicaciones.

En este apartado se pretende dar una visión general de los microscopios actuales que combinan microscopía de fuerzas (SFM) con microscopía óptica (MO). Para ello se presentan a continuación las principales características técnicas de los microscopios combinados diseñados por algunas de las compañías que los comercializan. Estos microscopios son muy semejantes entre ellos por lo que, tras indicar los rangos de barrido que realizan y si actúan sobre la punta o la muestra, se presentan agrupados los rasgos que comparten:

- El SFM NanoWizard3 [JPK] escanea la punta mientras la muestra permanece fija. Dispone de un rango de barrido de $100 \times 100 \times 15 \mu\text{m}^3$ en lazo cerrado.
- El microscopio MFP-3D BIO [Asylum Research]. Tiene un rango de barrido en lazo cerrado de $90 \mu\text{m} \times 90 \mu\text{m}$ en xy y un barrido en z superior a $15 \mu\text{m}$ que actúan sobre la punta,
- El modelo 6000 ILM [Agilent Technologies] realiza un barrido máximo en lazo cerrado de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ en xy y $30 \mu\text{m}$ en z . El barrido actúa sobre la punta del SFM.

- En el BioScope Catalyst [Bruker] el sistema piezoeléctrico actúa sobre la muestra con un rango de barrido de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ en xy y $20 \mu\text{m}$ en z. Trabaja tanto en lazo abierto como cerrado.

Las siguientes características son comunes a todos los equipos:

- El sistema de detección del SFM utiliza un láser infrarrojo.
- Disponen de un portamuestras para medidas en medio líquido o “celda líquida”.
- Tienen un módulo de control de temperatura generalmente opcional.
- Disponen de un módulo óptico de visión desde la parte superior del SFM.
- Disponen de una mesa motorizada XY con varios milímetros de rango para desplazar la muestra respecto a la punta.

1.3 Motivación y objetivos de esta tesis

En los últimos años, se ha producido una revolución espectacular en el campo de la Nanociencia, que se debe en gran medida a que ha sido posible entender y aprovechar los procesos que tienen lugar a la escala nanométrica y de esta forma abrir nuevas líneas de investigación. Sin embargo todavía queda un largo camino por recorrer hasta que todas las cosas que ocurren “en lo muy pequeño” se comprendan completamente. Este avance ha sido posible gracias a la utilización de técnicas de caracterización con resolución nanométrica como los microscopios de campo cercano, capaces de proporcionar imágenes de la estructura superficial de un gran número de sistemas en diferentes entornos con una altísima resolución lateral.

Actualmente, un reto importante en el campo de la Nanociencia es combinar las propiedades del SFM con las posibilidades espectroscópicas y de resolución temporal de la microscopía óptica tradicional. El interés de combinar la microscopía de campo cercano con la microscopía óptica convencional radica en la posibilidad de correlacionar imágenes y propiedades ópticas con las propiedades que se pueden

medir con las técnicas de campo cercano (topografía, adhesión, dureza, potencial de contacto) así como estudiar su evolución temporal y de esta forma ahondar en los fenómenos fotoinducidos. Para estudios con muestras biológicas el microscopio de campo cercano es una herramienta adecuada debido a su capacidad de obtener imágenes y medir fuerzas en un entorno fisiológico estable. La amplia variedad de aplicaciones pone de manifiesto el gran potencial de las técnicas de campo cercano en la investigación biofísica y biomédica. Por otro lado, el microscopio óptico es el instrumento principal en un laboratorio de Biología y en particular la microscopía de fluorescencia permite la visualización específica de moléculas marcadas llegando hasta una sensibilidad de una sola molécula. Otras técnicas ópticas proporcionadas por el microscopio óptico tales como el contraste de fase, campo oscuro y contraste interferencial o DIC dan información sobre la morfología y composición.

El objetivo de esta tesis es desarrollar un microscopio de fuerzas provisto de microscopía electrostática (ESFM) y microscopía Kelvin (KPM) especialmente diseñado para integrarse en un microscopio óptico invertido de forma que combine simultáneamente las técnicas de campo cercano con las técnicas ópticas. Su principal finalidad es aplicarlo no solo en el campo de la biología y la medicina, donde el microscopio óptico es un instrumento fundamental de trabajo, sino también en el campo de la biofísica y la física de materiales entre otros. Por tanto, es fundamental que sea una herramienta polivalente, versátil y modular para estudios interdisciplinarios.

Dada la gran cantidad de magnitudes que se pueden medir y la información que se puede obtener en los experimentos de campo cercano se puede considerar que tenemos “un laboratorio en la punta del SFM” (del libro *“The Lab on a Tip”* [Meyer-libro]). Manteniendo la punta fija en el eje óptico se puede tener un “laboratorio en la punta” no solo para los experimentos de SFM, sino también para las medidas ópticas. Aunque desde el punto de vista ideal, un sistema combinado es una potente herramienta que nos permite realizar numerosos y variados experimentos parece lógico que al combinar ambos tipos de técnicas la funcionalidad y resolución de las técnicas independientes se vea limitada por la presencia de las otras. Por este motivo, durante el diseño de nuestro sistema combinado un objetivo prioritario ha sido que todas las técnicas implementadas mantuvieran su resolución máxima.

Los modelos comerciales de microscopios combinados que existían al comienzo de esta tesis mantenían la muestra fija mientras la sonda del SFM realizaba

el barrido sobre la superficie de la muestra. Sin embargo, en el microscopio que se ha desarrollado en este trabajo la punta del SFM está siempre en el eje óptico y por tanto lo que se mueve en el barrido del SFM es la muestra con el fin de mantener **la sonda fija en el eje óptico**, mientras se desplaza la muestra para realizar el barrido. De esta forma no se limita la combinación de ambas técnicas solamente a obtener la imagen óptica simultáneamente con las medidas de SFM, sino que se pueden realizar verdaderos experimentos de campo cercano con el microscopio óptico. Mantener la punta del SFM en el eje óptico nos permite combinar la resolución nanométrica del microscopio de fuerzas con tres diferentes escalas de resolución de la microscopía óptica. Por un lado con la resolución micrométrica de la microscopía óptica clásica que abarca un amplio campo de visión. Por otro lado con la resolución submicrométrica ($\lambda/2$) de la microscopía óptica de gran resolución que permite estudiar moléculas individuales. Y por último con la resolución también nanométrica de la microscopía óptica de campo cercano (SNOM). Esto no sería posible si fuera la punta la que realizara el barrido, ya que el sistema óptico tendría que seguir a la punta en movimiento para las medidas combinadas. Resultaría muy complicado realizar ese seguimiento con una precisión de pocos nanómetros para el rango total de desplazamiento del sistema piezoeléctrico de unas cien micras o más.

La gran ventaja de este sistema radica en que todas las técnicas actúan en el eje óptico del microscopio por lo que se pueden aplicar sucesivamente todas las técnicas citadas en la misma región de la muestra, pudiendo después combinar los datos obtenidos. De esta forma, las aplicaciones típicas de este sistema se encuentran en el campo de la biología, ciencia de materiales, nano-fotónica y nano-óptica.

Una vez diseñado, construido y puesto a punto el microscopio SFM-MO, el objetivo ha sido demostrar su viabilidad y utilidad aplicándolo a experimentos de Ciencia de Materiales y Biología. En el primer caso, la combinación de luz y medidas eléctricas locales se empleará para la caracterización de materiales fotosensibles. La combinación de ESFM y KPM con microscopía óptica permitirá la caracterización electrostática en función de la iluminación

1.4 Estructura de la memoria de tesis

La presente memoria de tesis se divide de la siguiente manera. Tras este capítulo de introducción (capítulo 1), en el capítulo 2 se describen los fundamentos, componentes y principales modos de medida de las dos técnicas experimentales utilizadas en este trabajo: la microscopía óptica y la microscopía de fuerzas.

En los dos capítulos siguientes se describe el diseño y desarrollo instrumental de los microscopios de campo cercano combinados con microscopía óptica llevados a cabo durante la realización de este trabajo de investigación. El capítulo 3 toma como punto de partida las principales características que debería cumplir el microscopio combinado "ideal", para continuar con el diseño, desarrollo y puesta a punto del primer prototipo (SFM-1) y finalizar con las medidas realizadas con el fin de comprobar el correcto funcionamiento combinado de este microscopio.

En el capítulo 4 se muestran los criterios seguidos para el diseño del segundo prototipo (SFM-2) detallando las mejoras que incorpora respecto al SFM-1, que lo convierten en un microscopio más versátil y fácil de manejar. También en este caso se muestran las medidas que verifican el correcto funcionamiento el equipo.

Por último se incluyen los resultados científicos obtenidos con el SFM-1. El capítulo 5 muestra un estudio de fotodegradación en polímeros conductores en función de la radiación incidente, utilizando microscopía electrostática y Kelvin. Por último se presentan las conclusiones y las líneas futuras de trabajo.

1.5 Referencias

[Abbe 1874] Abbe, E. A Contribution to the Theory of the Microscope and the Nature of Microscopic Vision". *Proceedings of the Bristol Naturalists' Society* 1874; 1: 200–261.

[Agilent Technologies] www.agilent.com

- [Ando2012] Ando T, Uchihashi T, Kodera N. High-Speed Atomic Force Microscopy. *Japanese journal of applied physics* 2012; 51 (8) 08KA02
- [Asylum Research] www.asylumresearch.com
- [Baró-libro]. Baro AM, Reifenberger RG (Eds). *Atomic Force Microscopy in Liquid. Cap.8. Wiley-VHC* (2012)
- [Binnig82] G. Binnig, H. Rohrer. *Scanning Tunneling Microscopy. Helvetica physica acta* .55 (1982) 726
- [Binnig86] G. Binnig, C.F. Quate, C.H. Gerber, *Atomic Force Microscopy. Physic Review Letters*. 56 (1986) 930
- [Bruker] www.bruker.com
- [Coltharp2012] Coltharp, C; Xiao, J. Superresolution microscopy for microbiology. *Cellular Microbiology* 14 (2012) 12 : 1808
- [Ford 2002] Ford BJ. El nacimiento del microscopio. *ContactoS* 45, 29 (2002).
- [JPK] www.jpk.com
- [McMullan2006] McMullan D. Scanning electron microscopy 1928–1965. *Scanning* 17 (2006); 3: 175.
- [Meyer-libro] Meyer E, Hug HJ, Bennewitz R. “Scanning Force Microscopy. The lab on a tip”. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. (2004)
- [Thomson1897] Thomson JJ. Cathode Rays. *Proceedings of the Royal Institution* 1897; 1–14

- [Sugimoto 07] Y. Sugimoto, P. Pou, M. Abe, P. Jelinek, R Pérez, S. Morita, O. Custance. Chemical identification of individual surface atoms by atomic force microscopy. *Nature* 446 (2007) 64-67
- [Zernike 42] Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects *Physica* 1942; 9 (7): 686.

Capítulo 2. Técnicas experimentales

Como se ha visto en el capítulo 1, en los últimos siglos la microscopía ha evolucionado enormemente abarcando una gran cantidad de microscopios y técnicas de medida. La realización de esta tesis conlleva la combinación de dos tipos de microscopías. Por un lado la microscopía óptica y por otro la microscopía de campo cercano. En este capítulo se presenta una visión general de las técnicas experimentales empleadas en esta tesis y se muestran los fundamentos, componentes y principales modos de medida para cada una de ellas.

2.1 Microscopía Óptica

En este primer apartado se dará una visión general del microscopio óptico ya que es uno de los instrumentos de medida empleados en la realización de este trabajo y a la hora de diseñar el SFM tendremos que tener en cuenta sus componentes y la localización de los mismos. En los siguientes apartados se describen los fundamentos básicos de la microscopía óptica, los componentes del microscopio óptico invertido, las propiedades ópticas y el límite de resolución que puede alcanzar el microscopio. Este último es un parámetro fundamental, puesto que al combinar diversas técnicas hay que asegurarse de que las muestras se encuentren en el rango operativo de ambos microscopios. Por último veremos una breve descripción de los modos de medida empleados en este trabajo.

2.1.1 Fundamentos básicos

La microscopía de luz clásica o microscopía óptica, consiste en hacer pasar luz en el rango visible a través de un sistema de lentes, que dan lugar a la formación de una imagen de mayor tamaño que el objeto real, con lo que se obtiene una imagen ampliada de la muestra. La imagen resultante se puede detectar directamente por el ojo humano o registrarse con algún soporte digital.

En la figura 2.1 se muestra el camino óptico seguido por la luz en la formación de la imagen, lo que constituye el principio de funcionamiento del microscopio compuesto. Aquí se puede ver como la lente objetivo forma una imagen real e

invertida del objeto, mientras que la lente ocular proyecta una imagen virtual también invertida pero de mayor tamaño, siendo ésta última, la imagen formada con el sistema compuesto objetivo-ocular. El tamaño final de la imagen está determinado por el producto de la magnificación de ambas lentes, y la calidad de la misma por la cantidad de aberraciones corregidas por las lentes empleadas. Las aberraciones son las imperfecciones inherentes a toda lente que producen una imagen defectuosa. Las principales aberraciones que se corrigen son la esférica y la cromática. En la aberración esférica los rayos que proceden de los extremos de la lente no convergen en el mismo punto que los cercanos al eje de la lente, haciendo que el plano parezca curvo. La aberración cromática hace que el objeto se vea borroso debido a que las distintas longitudes de onda que componen la luz blanca, convergen en puntos focales diferentes. Para corregir las aberraciones geométricas se fabrican objetivos **planos** o aplanáticos. Para la corrección de las aberraciones cromáticas se elaboran objetivos denominan **acromáticos**, los cuales corrigen el rojo y el azul. Los objetivos **semiapocromáticos** son acromáticos que tienen una mayor apertura numérica. Los objetivos **apocromáticos** son los de mayor calidad, ya que además del rojo y el azul, corrigen el verde.

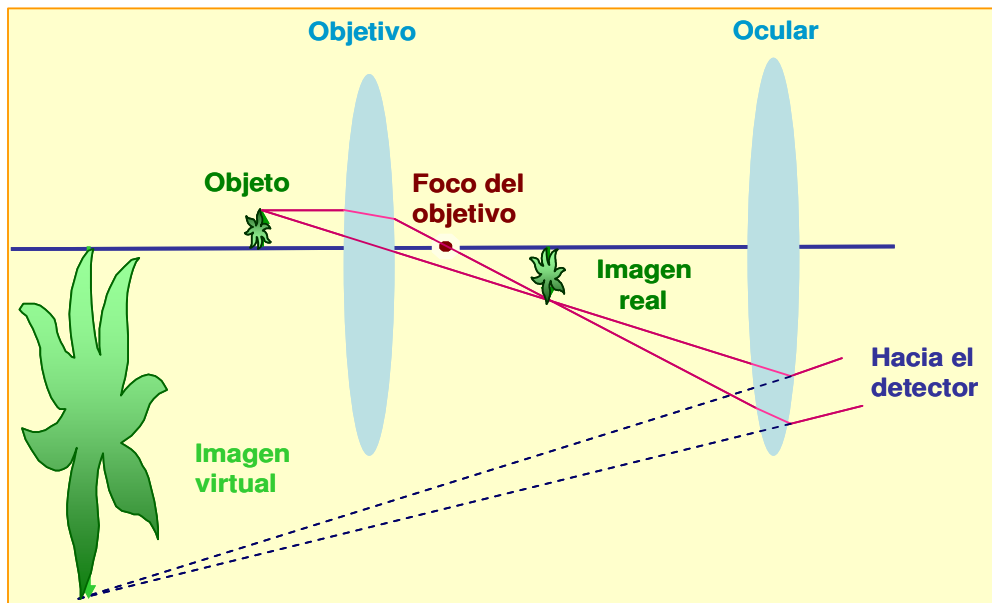


Figura 2.1. Principio de funcionamiento del microscopio óptico compuesto. La imagen formada con el sistema compuesto lente-ocular proviene de la formación en primer lugar de una imagen real e invertida del objetivo y posteriormente de la imagen virtual, invertida y de mayor tamaño proyectada por el ocular hacia el observador o el dispositivo de captura de imagen.

2.1.2 Descripción y componentes

A continuación se detallan los principales componentes del microscopio óptico, ya que su conocimiento resulta imprescindible para el correcto diseño del microscopio de fuerzas, permitiendo saber cual será la ubicación idónea y que características debe cumplir el SFM para que la funcionalidad del microscopio óptico no se vea reducida. En la figura 2.2 puede verse uno de los microscopios ópticos empleados en la realización de la tesis, así como sus principales componentes detallados a continuación.

Componentes mecánicos:

- El **estativo** es el soporte estable del microscopio sobre el que se ubican el resto de componentes.
- La **platina** está situada sobre el estativo o soporte y sobre ella se coloca la muestra, que por medio de un sistema de traslación se puede desplazar en las dos direcciones del plano XY o plano de la muestra.
- Los **mandos de enfoque** permiten el desplazamiento de los objetivos en la dirección vertical z para poder enfocar la muestra. Generalmente están formados por un enfoque macrométrico o grueso y por otro micrométrico o fino.
- El **revólver** es un dispositivo que soporta varios objetivos de distintos aumentos y que, por medio de un giro, permite colocar el objetivo elegido en la posición adecuada para su utilización.

Componentes ópticos:

- La **Fuente de iluminación** es la encargada de proyectar luz sobre la muestra. Suele ser una fuente halógena de bajo voltaje entre 6 y 12V, cuya intensidad se puede regular con un potenciómetro, con valores estándar entre 25 y 100W, También se pueden utilizar iluminación láser o diodos emisores de luz (LED) con la longitud de onda apropiada.
- El **condensador** es un sistema de lentes convergentes que concentran sobre la muestra los rayos provenientes de la fuente de iluminación. Su apertura

numérica debe ser al menos igual que la del objetivo para aprovechar todo el poder separador de éste último.

- El **diafragma** es una montura con un abertura circular regulable, que controla el paso de la luz a través del microscopio. Su función es evitar que los rayos de luz con aberraciones severas y la luz difusa lleguen al plano de la imagen, así como asegurar una adecuada distribución e intensidad de iluminación sobre la muestra. Por un lado el **diafragma de campo**, situado tras la lámpara, controla el diámetro que queda iluminado sobre la muestra, mientras que el **diafragma de apertura**, situado en el condensador ajusta el tamaño del haz y el ángulo de entrada de luz que llega a la muestra.

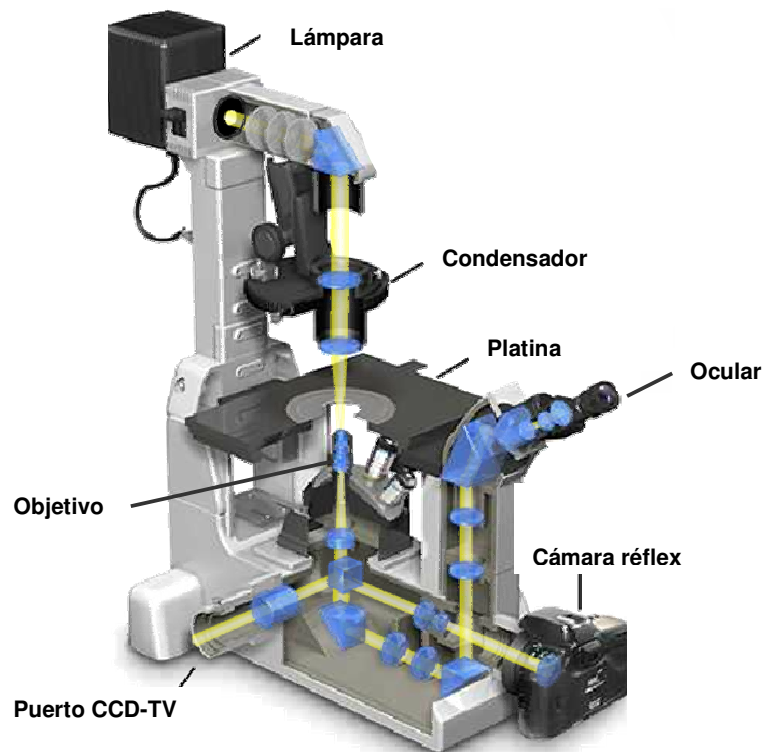


Figura 2.2. Esquema del microscopio óptico modelo TE 2000 de la marca Nikon. Se indican los principales componentes que lo forman y además se puede apreciar el camino óptico seguido por la luz cuando opera en transmisión. La imagen se ha obtenido de la página www.microscopyu.com

- El **objetivo** es un complejo sistema de lentes situado cerca de la muestra, que actúa como una sola lente convergente y produce una imagen ampliada de la muestra. Hay objetivos de distinta magnificación y apertura. Existen objetivos en seco y de inmersión. Los objetivos en seco se utilizan dejando aire entre

ellos y la preparación, mientras que el objetivo de inmersión se emplea colocando una gota de un líquido cuyo índice de refracción es superior al del aire, normalmente aceite, agua o glicerol. Los objetivos en seco alcanzan aperturas numéricas de 0.95 mientras que los de inmersión pueden llegar a 1.5. Generalmente está relacionada la apertura numérica del objetivo con la magnificación, de manera que objetivos de mayor aumento tiene una mayor apertura numérica. El objetivo es la parte más importante en la calidad de la imagen final del microscopio, por ello es fundamental que esté corregido frente a aberraciones tanto geométricas como cromáticas.

- El **ocular** por medio de dos lentes plano-convexas centradas, proyecta la imagen de la muestra aumentada por el objetivo en la retina del observador. Los oculares al igual que los objetivos pueden tener diferentes aumentos.
- El **detector** puede ser el ojo humano aunque generalmente se utiliza un **dispositivo de captura de imagen**, como una **cámara de fotos o video**, que permite visionar la imagen en el monitor del ordenador, así como guardar y procesar las imágenes por medio de un software específico. Estos dispositivos, se acoplan por medio de los puertos que posee el microscopio para tal fin. Por medio de **espejos o divisores de haz** se desvía el camino óptico para que llegue la luz procedente de la muestra, hacia uno de estos puertos en lugar de hacia el ocular.
- Los **filtros** más habituales son los grises o de densidad neutra, que reducen la intensidad de luz que llega a la muestra. El filtro verde se emplea para aumentar la resolución y el azul para resaltar contornos en muestras teñidas.
- Existen multitud de **accesorios** opcionales que pueden colocarse temporalmente en un lugar determinado del microscopio compuesto para desarrollar una labor específica, otorgando mayor flexibilidad y funcionalidad al equipo. Cabe destacar los accesorios propios de técnicas concretas de observación, como pueden ser **polarizadores** y **prismas** para *contraste interferencial o DIC*, **anillos de fases** que se sitúan en el condensador y en el objetivo para *contraste de fases*, un **disco opaco** en el condensador para *campo oscuro* o para medidas de *fluorescencia* **fuentes de iluminación** de una determinada longitud de onda y **filtros** específicos de excitación y emisión para determinados fluoróforos, así como accesorios para fotomicrografía.

2.1.3 Apertura numérica y límite de resolución

La **apertura numérica** (AN) es un número adimensional que depende de la capacidad del sistema óptico de recoger los rayos luminosos para un mayor rango de ángulos. Viene determinada por el índice de refracción del medio situado entre la lente y la muestra y por el cono de luz definido por el diámetro de la lente en relación a su distancia focal (figura 2.3). Se calcula según la siguiente expresión:

$$AN = n \cdot \text{sen}\alpha \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

siendo n el índice de refracción del medio óptico situado entre la lente del objetivo y la muestra y α la mitad del ángulo que forman los rayos más externos que entran en la lente. La máxima apertura numérica para cada índice de refracción tiene lugar cuando el semiángulo de los rayos que entran en la lente es máximo ($\alpha = 90^\circ$) y por tanto el $\text{sen}\alpha$ es igual a 1. Para los objetivos en seco, que trabajan en aire ($n=1$), la máxima AN que se puede alcanzar es 0.95 ($\alpha \approx 72^\circ$) debido al lugar que ocupa el soporte de las lentes en el objetivo y la separación entre éste y el cubreobjetos. Para los objetivos de inmersión en agua, la máxima AN es de 1,3 y si son de inmersión en aceite es de 1,5. En general cuanto mayor es la AN del objetivo menor es su distancia de trabajo que se define como la distancia que separa el objetivo y la muestra cuando ésta se encuentra enfocada.

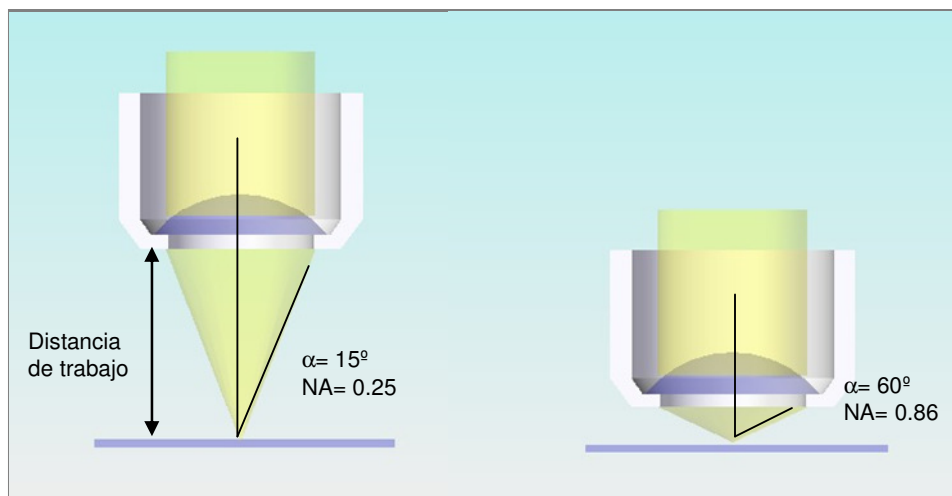


Figura 2.3. Esquema en el que se representan los parámetros que determinan la AN del objetivo. Como se puede ver en la imagen el ángulo de los rayos que entran en el sistema óptico, viene determinado por la relación que existe entre la apertura del objetivo y su distancia de trabajo.

El **límite de resolución** es la mínima distancia d a la que se encuentran dos objetos que pueden distinguirse como individuales. En un microscopio óptico la resolución está limitada por las propiedades de la luz, y se relaciona con la longitud de onda y la AN por la siguiente expresión formulada por Ernst Abbe (suponiendo despreciables las aberraciones ópticas):

$$d = \frac{\lambda}{2AN} = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha} \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

Así podemos conocer la máxima resolución teórica que puede alcanzar la microscopía óptica convencional, que se sitúa entorno a 200 nm, de manera que dos puntos en la muestra más cercanos que esta distancia no se pueden visualizar como individuales. Para poder aumentar la resolución hay que disminuir la longitud de onda con que se ilumina, aumentar al ángulo para el cual el objetivo recibe luz o aumentar el índice de refracción del medio óptico empleando un objetivo de inmersión. De manera general se considera que el límite de resolución de la microscopía óptica convencional viene dado por $\lambda/2$, para medidas realizadas con objetivos de gran apertura numérica en los que $\sin \alpha \approx 1$.

2.1.4 Propiedades del microscopio

- La **magnificación** de un microscopio óptico se define como la relación entre la longitud aparente de la imagen formada y la longitud del objeto. Se calcula multiplicando los aumentos del objetivo por los aumentos del ocular.
- **Poder separador** o **poder de resolución**. Es la inversa del límite de resolución.
- **Definición**. Es la capacidad de producir imágenes de contornos definidos, nítidos y correctos y depende de la calidad de las lentes y de la corrección de las aberraciones.
- **Poder de penetración** o **profundidad de campo**. Es la zona por encima y por debajo del plano focal, dentro de la cual la nitidez es aceptable. Así a mayor profundidad de campo se focaliza un mayor espesor de la muestra.

- El **campo de visión** del microscopio es el área de la muestra que se observa en el detector y es inversamente proporcional al aumento del microscopio. Para un objetivo de 10x es aproximadamente 2 mm, mientras que para uno de 50x es de unas 450 μm .

2.1.5 Técnicas ópticas de medida

En este apartado se muestra una breve descripción de las técnicas ópticas empleadas para la adquisición de imágenes con el microscopio óptico durante la realización de este trabajo. Se detallan someramente los principios de funcionamiento y los componentes necesarios, ya que escapa al objetivo de esta tesis ahondar en los fundamentos de cada técnica.

Las medidas que se han realizado con las técnicas que se detallan a continuación (excepto la epi-fluorescencia) se han llevado a cabo con luz transmitida. El microscopio trabaja en transmisión cuando la luz atraviesa la muestra y la luz difractada por ésta es recogida por el objetivo, que se sitúa al otro lado de la fuente de luz. Por el contrario trabaja en reflexión cuando la iluminación y la detección se realiza desde el mismo lado de la muestras. La primera configuración de trabajo permite observar muestras transparentes o láminas delgadas, mientras que la segunda se utiliza para observar muestras opacas que no permiten el paso de la luz.

- **Microscopía de campo claro**

En esta técnica la luz llega a la muestra procedente de la fuente de iluminación y el contraste se obtiene por la absorbancia producida en las zonas más densas, de forma que la muestra se visualiza sobre un fondo claro o brillante. Esta es la más sencilla de las técnicas de iluminación óptica ya que no requiere de componentes adicionales a los propios del microscopio óptico. Esta técnica óptica presenta poco contraste en la mayoría de las muestras biológicas por lo que, si la muestra no presenta coloración intrínseca, suelen ser necesarios métodos de tinción para incrementar el contraste.

- **Microscopía de campo oscuro**

La microscopía de campo oscuro es una técnica de iluminación que consiste en bloquear los rayos centrales procedentes de la fuente de iluminación y por tanto utiliza solo la iluminación oblicua o difusa para mejorar el contraste de las muestras semi-transparentes o sin teñir que ofrecen poco contraste con iluminación en campo claro. Con esta técnica de iluminación los bordes de la muestra aparecen brillantes sobre un fondo oscuro. Para obtener imágenes en campo oscuro es necesario emplear un condensador especial que bloquea los rayos centrales de la fuente de iluminación y un objetivo que tenga una apertura numérica igual o superior a la del condensador, ya que si es inferior, no llegará luz procedente del cono oblicuo de iluminación y por tanto el campo de observación será totalmente oscuro.

- **Microscopía de contraste de fases**

El microscopio de contraste de fases transforma una diferencia de grosor o índice de refracción en brillo o intensidad. Las muestras semitransparentes como cortes finos y sin teñir apenas disminuyen la amplitud pero desplazan la fase de la onda luminosa que las atraviesa. Nuestro ojo es capaz de detectar los cambios de amplitud pero no distingue diferencias de fase. Para transformar las diferencias de fase en diferencias de amplitud (que se traducen en diferencias de luminosidad) se utilizan dos anillos ópticos o “anillos de fase” cuyos campos anulares se hacen coincidir, uno está situado en el condensador y el otro en el objetivo. Así, la luz que pasa a través de una zona más gruesa o densa en una muestra semitransparente se retrasa y su fase queda desplazada de forma correspondiente respecto a la de la luz que ha pasado a través de una región más fina. Aprovechando los efectos de interferencia que se producen al combinar estos dos grupos de ondas se crea una imagen con la estructura de la muestra.

- **Microscopía de contraste de interferencia diferencial**

La microscopía de interferencia o técnica DIC (Differential-Interference Contrast), consiste en enviar un rayo luminoso a través de un objeto mientras otro pasa muy cerca del primero. Se trata de producir una interferencia con ambos rayos que pueda crear contraste. De esta manera se pueden medir con precisión cambios de fase muy

pequeños (de fracciones de longitud de onda). En el sistema de iluminación, sistemas ópticos diversos, desdoblan el rayo incidente en haces próximos unos del otro; un segundo sistema óptico, simétrico al primero, pero situado detrás del objetivo, recompone los dos haces haciéndolos interferir para construir la imagen.

Los componentes necesarios para la realización de esta técnica óptica son los siguientes: un polarizador, un prisma DIC (Wollaston 1) situado en el condensador, un prisma DIC (Wollaston 2) situado tras el objetivo y un analizador. El rayo polarizado pasa por un prisma Wollaston 1 (birrefringente) que lo parte en dos rayos próximos que pasan a través del condensador, el objeto y el objetivo. Como la distancia entre ambos es inferior al límite de resolución del microscopio (están separados una fracción de micra), solo se ve una única imagen. Mediante un segundo prisma Wollaston, el rayo doble vuelve a unificarse de nuevo, este prisma es el que en realidad crea la interferencia (destructiva o constructiva). Así el plano polarizado es recapturado por el analizador. Al desplazar el analizador en relación al polarizador se activa la interferencia lo que produce colores de polarización. Las estructuras orgánicas de refringencia distintas aparecen en color contrastado dependiendo del grosor, de la densidad y del índice de refracción.

- **Microscopía de fluorescencia**

Esta técnica permite detectar material fluorescente con gran sensibilidad. Si la muestra emite fluorescencia de manera natural se denomina autofluorescencia o fluorescencia primaria, mientras que si la fluorescencia se produce por la utilización de marcadores químicos, se trata de fluorescencia secundaria. El proceso de fluorescencia consiste en iluminar la muestra con una determinada longitud de onda que es absorbida por ésta y emitida con una longitud de onda mayor. Para que se pueda detectar este fenómeno es necesario el uso de filtros adecuados para la longitud de onda de excitación y emisión de cada fluoróforo.

El microscopio trabaja en epi-fluorescencia cuando se ilumina desde el objetivo con la longitud de onda que excita la fluorescencia de la muestra y la luz emitida por ésta es recogida por el objetivo, gracias a un juego de filtros apropiados. El dicroico refleja la luz de excitación hacia la muestra y transmite la luz procedente de la emisión de la muestra hacia el detector.

2.2 Microscopía de Fuerzas

El SFM es un instrumento que permite conocer las propiedades de una muestra a través de la detección de las fuerzas de interacción en el rango de los piconewtons, entre una punta afilada que actúa como sonda y la superficie de la muestra.

A continuación se detallan los principales fundamentos de la microscopía de fuerzas y posteriormente se describirán los componentes básicos que constituyen un SFM, así como los distintos modos de medida utilizados.

2.2.1 Fundamentos básicos del microscopio de fuerzas

A diferencia de la microscopía óptica en la que se *observa* la muestra por medio de la radiación incidente, en los microscopios de fuerzas las imágenes se obtienen *sintiendo* o *tocando* la muestra con una punta afilada situada al final de una micropalanca. Por eso la resolución del SFM no está relacionada con $\lambda/2$ como en la microscopía óptica. Los cambios en la interacción entre dicha punta y la superficie de estudio se obtienen midiendo las deflexiones de la micropalanca. Para poder medir fuerzas de 100 pm hay que poder medir deflexiones del orden de 1 Å.

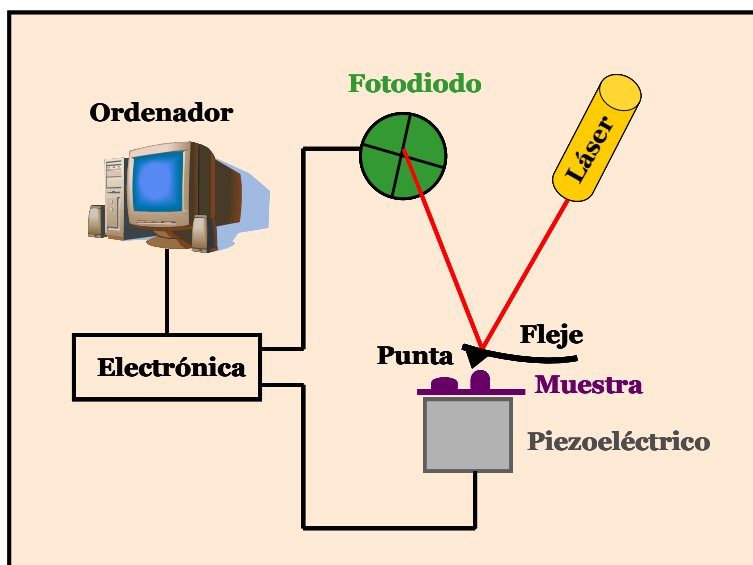


Figura 2.4. Esquema básico del montaje de un SFM y los componentes que lo forman

Para que el SFM funcione es imprescindible disponer de un sensor que permita detectar fuerzas pequeñas con gran sensibilidad, de un sistema de desplazamiento que permita variar con gran precisión la distancia entre punta y muestra, así como desplazar una respecto a la otra en la dirección del plano de la muestra para realizar imágenes, de un sistema de detección que recoja los cambios producidos en la posición del sensor de fuerzas y de un sistema electrónico e informático que procese las señales recibidas por el sistema de detección y controle el sistema de desplazamiento. En la figura 2.4 se muestra un esquema básico de un microscopio de fuerzas y en el siguiente apartado se detalla cada uno de los componentes que lo forman.

2.2.2 Componentes básicos del microscopio de fuerzas

En este apartado veremos de forma genérica los componentes que forman parte de un SFM. Las características particulares del SFM desarrollado durante la tesis se detallarán en los capítulos 3 y 4 para cada prototipo realizado.

- **Sensor de fuerza**

Se utiliza como sensor de fuerza una micropalanca o fleje que permite detectar las fuerzas de interacción entre la punta, situada en su extremo libre y la muestra. Al interaccionar ambas hace que el fleje se defleccione y/o torsione debido a las fuerzas normales (F_N) y/o laterales (F_L), respectivamente (figura 2.6). En ambos casos la relación entre la fuerza y el desplazamiento viene dado por la ley de Hooke:

$$\begin{aligned} F_N &= k_N \cdot \Delta z \\ F_L &= k_L \cdot \Delta x \end{aligned} \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

donde k_N es la constante de fuerza normal y k_L la constante de fuerza lateral de la micropalanca. La constante de fuerza nominal del fleje es k_N y por lo general es mucho menor que k_L .

Para ser sensible a fuerzas pequeñas en el rango del nanonewton, la constante de fuerza del fleje, k_N , debe ser pequeña (típicamente de 0,01 N/m hasta 3 N/m) y su

frecuencia de resonancia ω_0 , debe ser, al menos, del orden de kilohercios para evitar efectos derivados de vibraciones mecánicas. Ambos parámetros se relacionan a través de la masa efectiva por medio de la siguiente expresión:

$$\omega_0(d) = \sqrt{\frac{k_N + I''(d)}{m_{eff}}} \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

Donde $I''(d)$ es el gradiente de fuerza del potencial de interacción y m_{eff} es la masa efectiva. De esta forma la masa debe ser del orden de nanogramos y por tanto son necesarias técnicas de microfabricación para obtener micropalancas con baja constante de fuerza y altas frecuencias de resonancia [Binnig87]. Generalmente están fabricados de silicio o nitruro de silicio y pueden tener recubrimientos de materiales con una elevada reflectividad como el oro o el aluminio, de materiales conductores para medidas de electrostática o de materiales magnéticos para estudios de magnetismo, entre otros. Las micropalancas suelen ser rectangulares o triangulares y se encuentran fijas por un extremo a un chip milimétrico que permite cogerlo y colocarlo en el portapuntas del SFM. Los flejes suelen tener una longitud entre 100 y 300 μm , un ancho de 20 a 50 μm y un espesor entorno a 1 μm , como se puede ver en la figura 2.5. Con estas dimensiones se consiguen micropalancas con constantes de fuerza entre 0.005 y 100 N/m y se obtienen deflexiones del orden de nanómetros.

La punta suelen tener forma cónica o piramidal y una longitud entre 3 y 15 μm . El radio final de curvatura varía entre 10 y 100 nm, y cuanto menor sea este radio mayor será la resolución lateral que se puede alcanzar.

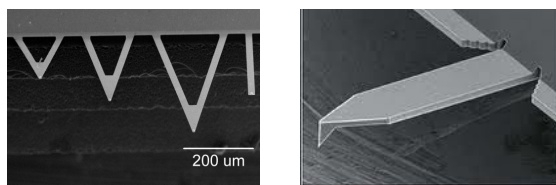


Figura 2.5. Imágenes de microscopía electrónica de micropalancas comerciales. A la izquierda se puede ver la forma y dimensiones de un fleje rectangular y tres triangulares en un mismo chip y a la derecha se puede apreciar la punta en la parte inferior del extremo libre. Las imágenes se han obtenido de la página web probe.olympus-global.com.

- **El sistema de detección**

Este sistema debe ser muy sensible, ya que es el encargado de detectar la deflexión y/o torsión sufrida por la micropalanca al interaccionar la punta y la muestra.

El más utilizado es un sistema de detección óptico basado en la deflexión de un haz láser que se focaliza en el extremo libre de la micropalanca, y a su vez, el haz reflejado se hace incidir en el centro de un fotodiodo segmentado en cuatro cuadrantes [Meyer88] [Alexander88]. Por medio de la deflexión y torsión del fleje varía la posición en la que incide el haz sobre el fotodiodo de manera que se genera un voltaje en cada cuadrante que es proporcional a la intensidad que recibe. Así la deflexión induce una diferencia de intensidades en los cuadrantes superior e inferior, mientras que la torsión dará lugar a una diferencia de intensidad en los cuadrantes laterales del fotodiodo (figura 2.6).

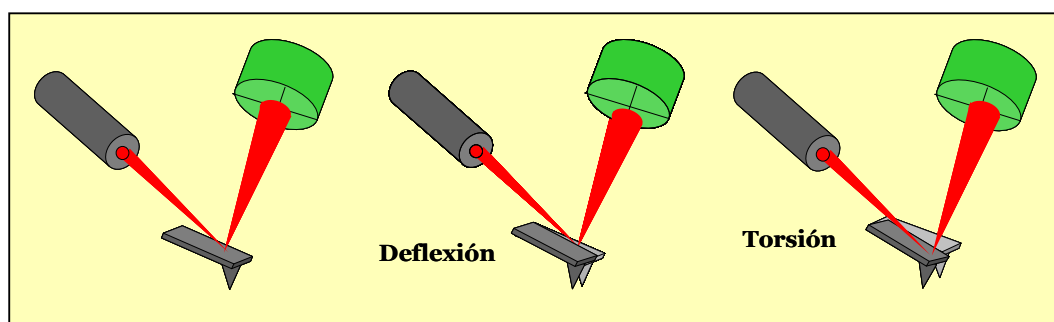


Figura 2.6 Esquema del funcionamiento del sistema de detección por deflexión de un haz láser. A la izquierda se muestra la posición inicial en la que el haz aparece centrado en el fotodiodo. En el dibujo central podemos ver como al detectar una fuerza normal, el fleje se deflecta y la posición del haz se desplaza hacia los cuadrantes inferiores. A la derecha se aprecia el desplazamiento lateral del haz láser que tiene lugar por la torsión del fleje como consecuencia de una fuerza lateral.

- **Sistema posicionamiento y barrido**

El sistema de barrido realiza el desplazamiento de la muestra en el plano horizontal (ejes x e y) y en la dirección vertical (eje z) respecto a la punta que permanece fija o viceversa. Dado que debe ser muy preciso se emplean cerámicas piezoeléctricas de Titanato Zirconato de Plomo también llamada PZT, del tipo $Pb(Zr_xTi_{1-x})O_3$ con las que se puede alcanzar resolución subnanométrica. Los materiales piezoeléctricos están formados por microscópicos cristales ferroeléctricos. En las cerámicas de tipo PZT estos cristales tienen una estructura tipo Perovskita, en la que la propia simetría de la estructura da lugar a un dipolo eléctrico, por el hecho de no coincidir los centros de simetría de las cargas positivas y negativas. Este dipolo es el responsable de que se produzca una diferencia de potencial eléctrico al someter el material a una deformación mecánica, lo que se conoce como efecto piezoeléctrico. Si

el efecto es inverso, el material se deforma al aplicar un voltaje externo, y así es como se realiza el desplazamiento que da lugar al barrido en cada eje.

Existen diferentes tipos de geometrías y montajes de piezoelectricos empleados en SFM. En los microscopios de fuerzas convencionales se utilizan tubos piezoeléctricos con electrodos internos y externos, que hacen que el tubo se contraiga o expanda al aplicar voltaje entre ambos electrodos. En el SFM desarrollado durante este trabajo de tesis, se han utilizado piezoeléctricos cuya geometría hacen que sea compatible con el empleo simultáneo de microscópica óptica, como veremos en el capítulo 3. En función de la geometría y las dimensiones del piezoescaner, los rangos típicos de desplazamiento que se suelen utilizar varía entre 10 y 200 μm en el plano de la muestra (xy) y de 1 a 20 μm entre punta y muestra (z). Es necesario realizar una calibración previa para cada sistema de barrido, que nos permita conocer con exactitud cuantos nanómetros se desplaza por cada voltio aplicado.

- **Unidad de control**

El control del microscopio se lleva a cabo por medio de un ordenador, un programa informático que controlan una unidad electrónica y un procesador digital de señales (DSP) [Nanotec].

Con el programa WSxM [Horcas07] se maneja el microscopio y se adquieren los datos en tiempo real. El mismo programa se utiliza también para procesar los datos adquiridos.

El DSP procesa la señal recibida por el fotodiodo y controla, por medio del sistema de realimentación o *feedback*, el movimiento del piezoeléctrico. El funcionamiento del microscopio de campo cercano se basa en este sistema de realimentación. Por medio del programa informático se fija un parámetro de referencia sobre la interacción punta-muestra o *set point*, que debe mantenerse constante para adquirir los datos. El DSP detecta los cambios de interacción a través de la señal recibida por el fotodiodo y cuando se alcanza el valor fijado el DSP envía el voltaje adecuado al piezoeléctrico para que acerque o aleje la muestra respecto a la punta manteniendo constante el valor de referencia, o lo que es lo mismo, haciendo cero la diferencia entre la magnitud medida en cada momento y la fijada con el *set point*. Para realizar este proceso el DSP utiliza un sistema PI (Proporcional Integral) digital.

El movimiento de la cerámica piezoeléctrica se controla por la magnitud del voltaje aplicado y la polaridad. Como acabamos de ver, el piezoeléctrico que actúa en la dirección z se controla con el sistema de realimentación. Sin embargo, para realizar una imagen es necesario que se desplacen los ejes del plano de la muestra. Los datos de la imagen se adquieren línea a línea, esto es, el piezoeléctrico xy desplaza la muestra respecto a la punta en la dirección x, o eje rápido, y cuando ha adquirido la línea se desplaza en la dirección y, o eje lento, para realizar una nueva línea en la dirección x. El tiempo de adquisición depende de la velocidad del barrido y del número de líneas que forman la imagen.

- **Sistema antivibratorio**

Para obtener alta resolución es preciso garantizar la estabilidad del sistema, aislando el microscopio de vibraciones mecánicas y variaciones térmicas procedentes del entorno. Si el microscopio es inestable, no podrán obtenerse buenas imágenes. La estabilidad depende, no solo del diseño, sino también de su instalación, por ello hay que situarlo sobre un sistema antivibratorio.

2.2.3 Modos de medida

- **Modo contacto**

En el **modo contacto** [Meyer 04] la punta se apoya sobre la muestra con un valor determinado de fuerza normal o deflexión del fleje, entonces el sistema de realimentación actúa sobre la distancia punta muestra para mantener constante dicho valor de fuerza normal. En este modo de medida se aplican fuerzas laterales que lo hacen incompatible con medidas de muestras blandas o fijadas débilmente al sustrato, ya que las modifica o las arrastra. Sin embargo, se utiliza este modo de medida para obtener mapas de fricción de la muestra, ya que normalmente estas fuerzas laterales son fuerzas de fricción.

- **Modo Jumping**

En el modo **Jumping** [dePablo98] el parámetro de control también es la fuerza que se aplica sobre la superficie. Sin embargo en este caso las medidas se realizan

acercándose a la muestra una distancia determinada hasta aplicar una fuerza fijada en el sistema de realimentación y volviéndose a alejar de la muestra la misma distancia para realizar el desplazamiento lateral. De esta forma se puede adquirir una imagen sin aplicar fuerzas laterales sobre muestras débiles, permitiendo su medida sin modificarlas. Durante este procedimiento de medida se realiza una curva de fuerza frente al desplazamiento entre punta y muestra (curva FZ) en cada punto de adquisición. En la figura 2.7 se muestra un esquema de una curva característica FZ medida en aire, donde se detallan las principales regiones tanto de la parte de acercamiento (trazo verde) como de alejamiento (trazo rojo):

- Valor de fuerza cero durante el acercamiento antes del contacto.
- Salto al contacto.
- Aumento de la fuerza normal hasta el valor de realimentación.
- Disminución de la fuerza normal según se separan punta y muestra.
- Perdida de contacto mecánico entre punta y muestra.
- Valor de fuerza cero durante el alejamiento después del contacto.

La histéresis que se produce en la curva entre el punto de salto al contacto (b) y el punto de pérdida de contacto (e) es debida a la adhesión de la muestra.

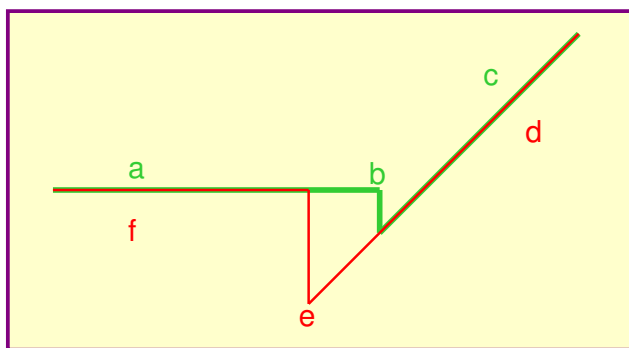


Figura 2.7. Esquema de una curva característica FZ adquirida en aire. El trazo verde muestra la curva de acercamiento, mientras que la roja muestra la curva de alejamiento. Las regiones a las que corresponden las letras que aparecen en la figura están detalladas en el texto.

- **Modos dinámicos**

Para eliminar o reducir las fuerzas de fricción que sufren las muestras en modo contacto, se desarrollaron los **modos dinámicos** [Martin87], en los que se hace

oscilar la micropalanca a su frecuencia de resonancia con amplitudes entre 1 nm y 100 nm. Para amplitudes de oscilación bajas se pueden adquirir las medidas sin realizar contacto mecánico entre punta y muestra y el sistema permanece en el rango atractivo del potencial de interacción. Sin embargo para amplitudes de oscilación elevadas, en cada periodo de oscilación, se realiza contacto mecánico con la muestra, lo que se denomina **modo tapping** o **contacto intermitente**. En este caso, el sistema es no lineal, ya que pasa en cada oscilación, del régimen atractivo al repulsivo del potencial.

En el **modo dinámico de modulación de amplitud (AM-DSFM)**, se mantiene constante la amplitud de la oscilación, mientras que en el **modo dinámico de modulación de frecuencia (FM-SDFM)**, el parámetro que mantiene constante el sistema de realimentación es la frecuencia de resonancia.

Para las medidas en modos dinámicos se utiliza otro sistema de realimentación llamado PLL (*Phase Lock Loop*). Este sistema ajusta a cero el desfase inducido por el cambio de frecuencia producido por la interacción punta-muestra, de forma que el sistema trabaja siempre en resonancia con la máxima amplitud [Albrecht91].

2.2.4 ESFM y KPM

La microscopía electrostática de campo cercano (ESFM) permite conocer las propiedades electrostáticas de la muestra a escala nanométrica y la microscopía Kelvin (KPM) es una herramienta que permite obtener un mapa de topografía y de potencial de contacto local con resolución lateral inferior a 10 nm [Palacios-Lidón2009]. El mapa de potencial de contacto da información sobre la composición y los estados electrónicos de estructuras locales en la superficie de un sólido. Para desarrollar estas técnicas se desplaza una sonda recubierta con un material conductor que actúa como electrodo de referencia sobre la superficie de la muestra, formando ambas un condensador.

En ausencia de fuerzas de contacto, la interacción punta-muestra (I_{p-m}) proviene de la interacción Van del Waals y la interacción electrostática:

$$I_{p-m}(d, V_p) = \frac{AR}{3d} + \frac{C(d)}{2}(V_{p-m})^2 = \frac{AR}{3d} + \frac{C(d)}{2}(V_p - V_{CP})^2 \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

donde R es el radio de la punta, A es la constante de Hamaker, d es la distancia punta-muestra, $C(d)$ es la capacidad entre punta y muestra, V_p es el voltaje aplicado a la punta y V_{CP} el potencial de contacto local entre punta y muestra [Hu95, Guggisberg2000]. La ecuación 2.5 describe la energía del sistema punta-muestra, sin embargo en un experimento de SFM solo se pueden determinar la deflexión o fuerza

$$F(d) = -I'(d) \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

o la variación en la frecuencia de resonancia o gradiente de fuerza

$$\Delta\omega \cong \omega_0 I''(d) / (2c_{fleje}) \quad (\text{Ecuación 2.7})$$

donde ω_0 es la frecuencia de resonancia libre y c_{fleje} la constante de fuerza de la micropalanca. Esta última expresión solo se cumple para pequeñas variaciones de la frecuencia y pequeñas amplitudes de oscilación. Aunque a priori parezca equivalente adquirir una u otra, se ha demostrado que la detección del gradiente de fuerza proporciona mayor resolución, mejor relación señal-ruido y resultados más cuantitativos [Colchero2001, Palacios-Lidón2005, Zerweck2005].

La dependencia cuadrática de la interacción electrostática con el voltaje (ecuación x) es la base del método Kelvin. En esta técnica se modula el voltaje aplicado entre punta y muestra (V_p) por una señal armónica del tipo $V_p = V_{DC} + V_{AC} \sin(\omega t)$. Al desarrollar el cuadrado del voltaje se obtienen tres términos dependientes de la frecuencia. Un término constante que depende del voltaje en continua (V_{DC}), así como dos señales periódicas moduladas, una en el primer armónico ω proporcional a $C''(d) V_{AC} (V_{DC} + V_{CP})$ y otra en el segundo armónico 2ω proporcional a $C''(d) V_{AC}^2$, donde $C''(d)$ es la segunda derivada de la capacidad.

La componente en ω se emplea como señal de electrostática. Esta señal depende de la capacidad del sistema punta-muestra (que a su vez depende de la distancia punta-muestra), del voltaje aplicado y del potencial de contacto local. Sin embargo, la información acerca de la topografía (distancia punta-muestra durante la imagen) y las propiedades electrostáticas de la muestra (capacidad y potencial de contacto) están mezcladas en este tipo de señal. Para obtener únicamente la imagen de potencial de contacto se utiliza la técnica Kelvin, que consiste en anular la componente en ω de la señal de electrostática ajustando el voltaje aplicado a la punta con un sistema de realimentación auxiliar. De esta forma $V_{DC} = V_{CP}$ y por tanto el voltaje aplicado a la punta es justamente el potencial de contacto de la muestra.

2.3 Referencias

- [Albrecht91] Albrecht, T.R. Grütter, P. Horne, D. Rugar, D. Frequency-modulation detection using high-q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity *Journal of Applied Physics*. 69, 15 (1991)
- [Alexander88] Alexander S, Hellemans L, Marti O, Schneir J, Elings V, Hansma PK. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *Journal of Applied Physics* 65:164 (1988).
- [Binnig87] Binnig, G; Gerber, C; Stoll, E; et al. Atomic resolution with atomic force microscope. *Europhysics letters* 3 (12) 1281-1286 (1987).
- [Colchero2001] Colchero J, Gil A, Baró AM, Resolution enhancement and improved data interpretation in electrostatic force microscopy *Physical Review B* 64 (24), 245403 (2001).
- [dePablo98] de Pablo, PJ; Colchero, J; Gomez-Herrero, J; et al. Jumping mode scanning force microscopy *Applied physics letters* 73 (22) 3300 (1998).
- [Dürig92] Dürig U, Züger O, Stalder A. Interaction force detection in scanning probe microscopy - methods and applications *Journal of Applied Physics*. 72 1778 (1992)
- [Guggisberg2000] Guggisberg M, Bammerlin M, Loppacher C, Pfeiffer O, Abdurixit A, Barwich V, Bennewitz R, Baratoff A, Meyer E, Güntherodt HJ. Separation of interactions by noncontact force microscopy *Physical Review B* 61 (16) 11151 (2000)

- [Horcas07] Horcas, I. Fernández, R. Gómez-Rodríguez, J. M. Colchero, J. Gómez-Herrero, J. Baró, A. M. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments* 78 (1) 013705 (2007).
- [Hu95] Hu J, X.D, Xiao XD, Salmeron M. Scanning polarization force microscopy - a technique for imaging liquids and weakly adsorbed layers. *Applied Physics Letters* 67 (4), 476 (1995)
- [Martin87] Martin, Y; Wickramasinghe, HK. Magnetic imaging by force microscopy with 1000-Å resolution. *Applied Physics Letters* 50 (20) 1455 (1987).
- [Meyer88] Meyer G, Amer NM. 1988. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* 53 (12): 1045 (1988)
- [Meyer2004] Meyer E, Hug HJ, Bennewitz R. "Scanning Force Microscopy. The lab on a tip". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. (2004)
- [Nanotec] www.nanotec.es
- [Nonnenmacher91] Nonnenmacher M, O'Boyle MP, Wickramasinghe HK. Kelvin probe force microscopy. *Applied Physics Letters* 58(25):2921e3 (1991)
- [Palacios-Lidón2005] E. Palacios-Lidón, J. Abellán, J. Colchero, C. Munuera, C. Ocal. Quantitative electrostatic force microscopy on heterogeneous nanoscale samples. *Applied Physics Letters*. 87, 154106 (2005)
- [Palacios-Lidón2009] Palacios-Lidón E, Pérez-García B, Colchero J. Enhancing dynamic scanning force microscopy in air: as close as possible. *Nanotechnology* 2009; 20(8): 085707.

- [Zerweck2005] U. Zerweck, C. Loppacher, T. Otto, S. Grafström, L.M. Eng. Accuracy and resolution limits of Kelvin probe force microscopy. Physical Review B 71, 125 424 (2005)

Capítulo 3. Diseño y desarrollo del SFM combinado con microscopía óptica

En este capítulo se describe el proceso de diseño, desarrollo, fabricación, montaje y puesta en marcha del primer prototipo de SFM (SFM-1) combinado con microscopía óptica llevado a cabo durante la tesis y que se ha empleado en las medidas mostradas en el apartado 3.3 así como en los experimentos realizados en el capítulo 5.

Como punto de partida para realizar el diseño de un SFM que pueda combinarse con un microscopio óptico, hay que plantearse cuáles son las cualidades óptimas que debe tener dicho equipo, o lo que es lo mismo, como sería el microscopio “ideal”. Posteriormente hay que ver que requerimientos son viables de forma que el microscopio que se va a diseñar ó microscopio “real” esté lo más próximo posible al microscopio “ideal”. Por último, hay que confirmar que todas las premisas que “a priori” se suponen óptimas, proporcionan el resultado esperado una vez el microscopio está en funcionamiento y en caso contrario realizar las modificaciones necesarias.

3.1. El microscopio combinado “ideal”

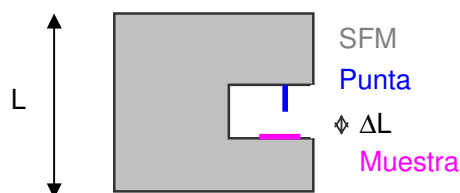
Algunos de los requerimientos que debe cumplir nuestro SFM “ideal” son comunes a todos los microscopios de campo cercano, mientras que otros son específicos de la combinación con microscopía óptica.

3.1.1. Criterios generales del SFM “ideal” para el diseño

Entre los requisitos que comparte con cualquier microscopio de campo cercano figuran:

- **Estabilidad mecánica** –Su elevada estabilidad permite al SFM ideal medir con gran resolución muestras de tamaños comprendidos entre pocos nanómetros y cientos de micras, tantas como permita el sistema de barrido. Para que el microscopio sea mecánicamente estable, debe verse afectado lo menos posible por movimientos o vibraciones. Por una parte está la estabilidad propia del microscopio, relacionada con el diseño y por otra la estabilidad que se

obtiene de aislar el SFM de las perturbaciones del entorno. Para conseguir esta última el microscopio combinado se sitúa sobre una mesa antivibratoria que absorbe los impactos y las vibraciones externas y reduce la frecuencia de oscilación a unos pocos hercios por medio de sistemas de amortiguación, como muelles o elementos elásticos. En un modelo muy simple la estabilidad propia del SFM (ΔL) está relacionada con el módulo de Young (E), la altura del microscopio (L) y la fuerza por unidad de superficie por medio de la siguiente expresión [Colchero-Tesis]:

$$\Delta L = \frac{L}{E} \frac{F}{A} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$


Por tanto para tener una buena estabilidad, la variación ΔL en la posición relativa entre punta y muestra debe ser lo menor posible, y para ello E debe ser grande y L pequeño.

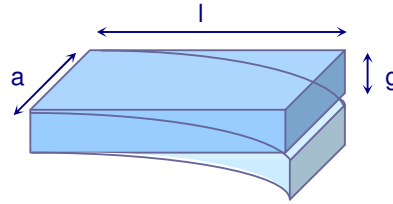
- **Estabilidad térmica** – El SFM debe estar compensado térmicamente para que no se vea afectado por dilataciones no homogéneas en el equipo que produzcan derivas térmicas. Para compensar estos efectos hay que diseñar los componentes con el mismo material o materiales con similar *coeficiente de dilatación térmica* (variación en la longitud que experimenta un cuerpo debido a un cambio en la temperatura). También es importante aislar en microscopio con un sistema cerrado que permita mantener una temperatura estable mientras mide, reduciendo así al mínimo las variaciones de temperatura que pueda sufrir.
- **Rigidez** – Por un lado los componentes deben diseñarse para ser resistentes a la deformación producida por esfuerzos de flexión y torsión. Por otro lado, el conjunto de las piezas debe ensamblarse con precisión y robustez para mantener la rigidez del equipo. En nuestro caso, el criterio empleado establece que las piezas diseñadas tengan una rigidez mayor que el sistema piezoeléctrico comercial que utilizamos. De esta forma, es el sistema de barrido el que limita la rigidez del microscopio y con este criterio ni se sobrestima ni se infravalora la rigidez que deben tener las piezas.

La deformación que sufre una pieza (Δz) cuya superficie es mayor que su espesor es la misma que se emplea para calcular la deformación del fleje y está relacionada con la rigidez de la pieza (c) y la fuerza de deformación (F) que actúa sobre ella, por medio de la ley de Hooke:

$$\Delta z = \frac{1}{c} F \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

En el caso más simple de una pieza rectangular, como se muestra en la siguiente figura, la constante de fuerza c viene dada por la siguiente expresión:

$$c \left[\frac{N}{m} \right] = \frac{1}{4} E \cdot a \left(\frac{g}{l} \right)^3 \quad (\text{Ecuación 3.3})$$



donde E es el módulo de Young, a es el ancho, g el espesor y l la longitud de la pieza. De los datos proporcionados por el fabricante obtenemos que la rigidez del piezoeléctrico es de 1.5×10^6 N/m. Así, queremos que el término derecho de la ecuación 3.3 sea mayor que este valor o lo que es lo mismo, que la rigidez de las piezas sea mayor que la del sistema de barrido. Teniendo en cuenta que el módulo de Young del Aluminio es de 70 GN/m, y suponiendo el ancho de la pieza de 0.2 m, obtenemos que la rigidez c viene dada por $3.5 \times 10^9 (g/l)^3$. Este valor es más de 1000 veces superior que la rigidez del piezoeléctrico si $(g/l)^3 = 1$. Para que este valor sea 10^{-3} la relación entre el espesor de la pieza y su longitud es $g = l/10$, con lo que la longitud de la pieza debe ser diez veces su espesor.

Al diseñar piezas de gran tamaño, hay que tener en cuenta la rigidez de las mismas frente al peso. Una rigidez mayor implica un aumento de peso y tamaño ya que las piezas deben tener mayor espesor para tener mayor rigidez. Sin embargo hay que llegar a una solución de compromiso para que la frecuencia de resonancia (ω) de las piezas no sea muy baja, de esta manera conviene que tengan menos masa (m) y por tanto sean más ligeras, ya que $\omega^2 = c/m$, donde c representa la rigidez.

- **Facilidad y comodidad en el manejo** – Estas características son de gran ayuda ya que facilitan su utilización y reducen el tiempo de trabajo.

Es fundamental saber qué características son prioritarias porque afectan al correcto funcionamiento del SFM y cuales son secundarias. La rigidez y la estabilidad son fundamentales, ya que el SFM debe tener una resolución nanométrica, mientras que características que facilitan el uso son deseables pero no imprescindibles ya que no limitan la resolución del SFM. En algunos casos unas características son opuestas a otras. Que el SFM sea pequeño y ligero puede hacer que el sistema sea más manejable en posibles desplazamientos o si fuera necesario montarlo y desmontarlo en diversas ocasiones, sin embargo podría dar lugar a una pérdida de rigidez y por tanto de precisión en la medida. Así hay que dar prioridad a las características que implican un funcionamiento mejor del equipo.

3.1.2. Criterios específicos para el diseño del SFM "ideal"

Como ya se ha mencionado anteriormente, al diseñar un microscopio de fuerzas que va a ser combinado con un microscopio óptico, no basta con tener en cuenta los criterios propios del SFM sino que también hay que considerar los criterios derivados de la combinación de ambas técnicas. Estos criterios son:

- **Adaptabilidad** – El SFM debe estar perfectamente adaptado e integrado de manera que no interfiera o interfiera lo mínimo posible con el funcionamiento del microscopio óptico.
- **Modularidad** - Permite el uso del SFM y del microscopio óptico (MO) por separado y de manera simultánea. Al ser modular el SFM se puede separar tanto íntegra como parcialmente del MO de forma que éste aproveche al máximo su capacidad de funcionamiento.
- **Versatilidad**- Es posible colocarlo sobre distintos ópticos invertidos con solo añadir una pieza en la base que permita el acoplamiento a cada microscopio.

El microscopio óptico invertido está especialmente diseñado para trabajar tanto en transmisión como en epi-fluorescencia. En el caso de muestras biológicas, es posible observar microorganismos, muestras transparentes o tejidos en cultivo sin una preparación previa, favoreciendo el seguimiento del estado de crecimiento, comportamiento y demás parámetros involucrados en el desarrollo del cultivo. Por el hecho de trabajar con un microscopio invertido, las muestras objeto de estudio deben

estar depositadas sobre un sustrato transparente para poder ser observadas. Además el espesor de dicho sustrato transparente, generalmente un cubre objetos, tiene que ser igual o inferior a la distancia de trabajo del objetivo que se va a utilizar en la observación, ya que si el sustrato tuviera un espesor superior, el punto focal del objetivo quedaría dentro de éste, de forma que no alcanzaría a enfocar la muestra y por lo tanto no podríamos observarla.

Para satisfacer los criterios generales mencionados anteriormente hay que tener en cuenta una serie de limitaciones que nos impone el sistema. Debido a que el SFM va situado sobre el MO, existe una limitación de tamaño relacionada con el estativo del MO. Dicho de otro modo, para que el SFM pueda situarse sobre el MO debe tener un tamaño en su base y unos puntos de anclaje compatibles con la platina donde se coloca la muestra en el MO. Es decir, dado que el MO no tiene que verse modificado por la integración del SFM, en el diseño llevado a cabo únicamente se quita la platina del estativo y en su lugar se coloca el microscopio de fuerzas. Por otro lado hay una limitación en la altura del SFM y fundamentalmente en la colocación de los componentes, para que la parte superior del mismo no interfiera con el condensador y la parte inferior permita el giro de los objetivos colocados en el revólver.

Como la funcionalidad del MO es un requisito imprescindible, al realizar el diseño del SFM es fundamental que se pueda mantener la máxima apertura numérica posible tanto en la iluminación desde arriba como en el objetivo en la parte inferior, de manera que la AN quede limitada exclusivamente por el objetivo que se emplee, sin verse afectada por ningún componente del SFM. Para lo primero hay que evitar que las piezas del SFM puedan entrar en el cono óptico de la AN del condensador y para lo último si el SFM tuviera que tener alguna pieza por debajo del plano de la muestras, esta tendría que estar fuera del cono definido por el giro de los objetivos situados en el revólver.

Para realizar técnicas de contraste de fases y de contraste interferencial o DIC el condensador debe tener una buena AN (al menos de 0.5 lo que equivale a un ángulo de 30°). En la realización del diseño se ha impuesto como condición que ninguna pieza del SFM invada un cono de 40° de semi-ángulo, con el vértice situado en la muestra, lo que equivale a una AN de 0.64. En principio ésta condición de apertura numérica es lo suficientemente conservadora para considerar que el SFM no afecta al normal funcionamiento del MO, ya que pocos condensadores tienen una AN superior a 0.64. El inconveniente que puede surgir en la incompatibilidad de uso de

ciertos condensadores está relacionado con la distancia de trabajo y el tamaño del condensador. Como se puede ver en la figura 3.1 el cono de AN que respetamos en el diseño del SFM es más estrecho que el diámetro típico de los condensadores a la distancia a la que éstos suelen colocarse, ya que además, cuanto mayor es la AN del condensador menor suele ser su distancia de trabajo o lo que es lo mismo la distancia a la que se coloca de la muestra.

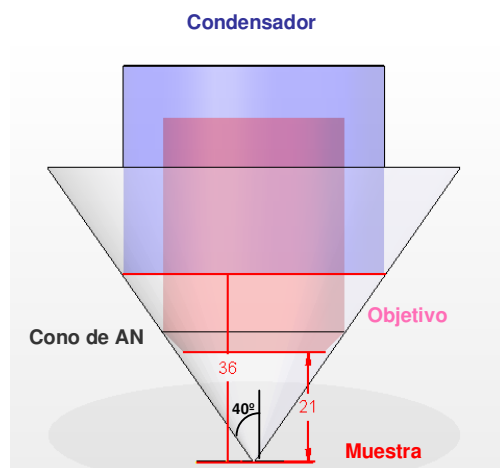


Figura 3.1. Esquema entre la relación del diámetro de un condensador (50 mm) y de un objetivo (35 mm) y la distancia de trabajo (36 mm y 21 mm respectivamente) para una AN dada, que en este caso es de 0.64, equivalente a un cono de 40° de semiángulo.

En la realización del diseño del microscopio de fuerzas se ha contemplado la posibilidad de que el condensador choque con la mecánica del SFM. Si esto ocurriera, tendríamos las siguientes soluciones para realizar las medidas combinadas. Para llevar a cabo el experimento de forma simultánea con ambas técnicas, esto es "in situ" e "in tempore" (en el mismo sitio y en el mismo momento), habría que sustituir el condensador por un objetivo, ya que al tener un diámetro menor se puede acercarse más a la muestra para una misma AN, de forma que se reduce la distancia de trabajo necesaria. Si no es posible sustituir el condensador por un objetivo y es imprescindible utilizar un condensador de gran AN que interfiera con el microscopio de fuerzas, existe la posibilidad de quitar rápida y fácilmente el sistema de detección, que por situarse más cerca del condensador es la parte que chocaría con éste, y así permitir la utilización del condensador sin tener que desmontar el SFM. En este caso se pueden adquirir las imágenes con ambas técnicas, aunque no de manera simultánea, es decir, "in situ" pero "ex tempore". También existe la posibilidad de desplazar el SFM hacia un lado por medio de guías, lo que permite utilizar solo el MO con todas sus prestaciones sin tener sobre él el SFM pero sin necesidad de desmontarlo. Tener acceso a la

muestra con $AN = 1$ desde ambos lados ofrece la posibilidad de utilizar técnicas ópticas que superan el límite de difracción, como la microscopía 4pi.

Además, la posición de la muestra en el SFM tiene que coincidir con el plano focal del MO. Este plano focal tiene una variación en altura de unos pocos milímetros que se ajusta al focalizar la muestra por medio de unos tornillos graduados, que posee el MO, que acercan o alejan el objetivo situado en el revolver.

Finalmente, un punto fundamental de partida en el diseño del SFM consiste en definir si el barrido del sistema piezoeléctrico que posee el microscopio va a actuar sobre la muestra o sobre la punta. Tal como se justificó en el capítulo 1, la opción que consideramos más apropiada por el hecho de estar el SFM combinado con un MO es que la punta permanezca fija en el eje óptico y sea la muestra la que se desplace. De esta forma el punto de interés, que es el que permanece bajo la punta, siempre se encuentra en el eje óptico, y así se pueden realizar también experimentos ópticos de campo cercano de tipo SNOM (Microscopio óptico de campo cercano del inglés *Scanning Near Field Optical Microscopy*)

Resumiendo, los requisitos que consideramos que debe cumplir el SFM para combinarlo con un MO son:

- El tamaño de la base del SFM está limitado por las dimensiones del MO, especialmente en la distancia delimitada entre el ocular y el brazo que porta la fuente de iluminación.
- En la parte superior las piezas del SFM deben respetar un cono de luz para no limitar la AN del condensador, en este caso la máxima AN para medidas en transmisión será de 0.64.
- Para mantener la máxima AN en la parte inferior (necesaria para utilizar objetivos de inmersión) ningún componente del SFM debe quedar por debajo de la muestra en el cono descrito por el giro de los objetivos.
- La muestra tiene que situarse en el plano focal.
- Para permitir el uso de objetivos de inmersión, la muestra debe depositarse sobre un cubre-objetos de tan solo 0,17 mm de espesor que corresponde con la distancia de trabajo de dichos objetivos.

- La punta del SFM tiene que estar en el eje óptico.
- Para que la combinación de ambas técnicas pueda realizarse, el SFM debe tener una cavidad hueca que permita el paso de la luz a través de la muestra hasta el objetivo.

Teniendo en cuenta lo anterior, las piezas del SFM se deben colocar desde el plano focal hacia arriba, pero teniendo en cuenta que hay que permitir que la luz entre con la máxima AN posible para no limitar las propiedades ópticas del MO (figura 3.2).

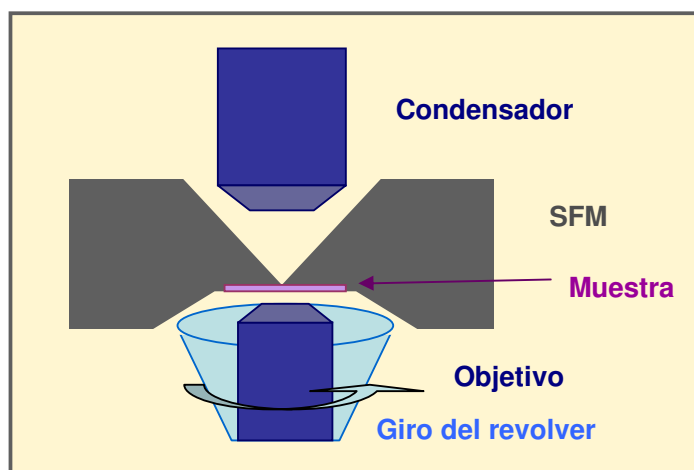


Figura 3.2. Esquema con las características geométricas y los requisitos en la distribución de los componentes que debe cumplir el SFM para no interferir con el MO y por tanto no limitar la funcionalidad de éste. En la parte superior el SFM no debe invadir el cono de luz que utiliza el sistema óptico para ilumina la muestra. Cuanto mayor sea el ángulo de este cono, mayor será la AN del condensador que se puede emplear. En la parte inferior no debe haber ningún componente que interfiera con el giro de los objetivos.

3.1.3 Criterios del sistema de barrido para el diseño

El sistema de barrido juega un papel fundamental en un SFM, ya que de él depende en gran medida la resolución del microscopio y de sus propiedades mecánicas dependen las propiedades de resonancia del sistema y las características del sistema de retroalimentación. Por tanto es fundamental conocer los criterios que debe cumplir el sistema de barrido con el fin de elegir correctamente el sistema piezoeléctrico que se utilizará en el microscopio "real" que se va a construir.

Como se ha mencionado anteriormente un requisito indispensable para que el SFM esté combinado con microscopía óptica es que exista una cavidad hueca en el

SFM que permita el paso de la luz a través de la muestra. En un microscopio de fuerzas convencional los piezoeléctricos son tubulares y están encerrados en una carcasa, de manera que no permiten el paso de luz a través de la muestra. Existen diversos modelos de sistemas de barrido con un orificio central, pero hay que tener en cuenta todas las características técnicas, para elegir el más adecuado en función del tamaño y velocidad de barrido deseado, y además que tenga unas dimensiones apropiadas para el diseño, en concreto que el hueco central permita el alojamiento de la muestra.

Por tanto, el diseño del SFM tiene su punto de partida en el sistema piezoeléctrico que se elija, ya que éste determinará tanto la geometría como el tamaño final del SFM. Por eso es importante tener una idea bastante aproximada del tamaño del sistema de barrido que se puede emplear en función del tamaño del microscopio óptico al que se quiere acoplar. Hay que tener en cuenta el espacio que ocupan las piezas que serán necesarias para realizar las mesas de desplazamiento en xy , tanto para colocar la punta sobre el eje óptico, como para desplazar la muestra respecto a la punta. También hay que evaluar el hueco interior que debe tener el piezoeléctrico para que se puedan colocar los componentes necesarios para fijar la muestra y permitir el desplazamiento de la misma a otra zona distinta. Puesto que no vamos a desarrollar nosotros mismos el sistema de barrido, sino que vamos a adquirirlo a una empresa especializada, hay que ajustarse a los modelos y medidas existentes en el mercado.

Para la realización del SFM-1 se han empleado diversos sistemas piezoeléctricos de barrido de la marca Physik Instrumente [PI]. En un primer momento se empleó el modelo P-733.3DD que simplificaba el diseño del SFM por el hecho de incorporar el barrido en los tres ejes xyz ($30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, respectivamente). Sin embargo esta aparente ventaja resultó ser un inconveniente y no se obtuvieron los resultados esperados. Al estar acoplados los 3 ejes, se inducen perturbaciones en el eje z al barrer en las direcciones xy , restando de este modo estabilidad y por tanto resolución al SFM. Este efecto es mayor al aumentar la velocidad de barrido y es especialmente crítico en el modo jumping, como se verá en el capítulo 4. Para solucionar este inconveniente se sustituyó el modelo anterior por el P-733.2CD, que posee las mismas dimensiones, pero realiza el barrido únicamente en los ejes xy ($100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$). En este caso se incorporó el barrido en el eje vertical con 3 piezoeléctricos cilíndricos para el desplazamiento en z , con un rango de $15\ \mu\text{m}$ (modelo P-810.10).

3.2. Diseño del primer prototipo: SFM-1

Una vez que se han establecido las características que hay que tener en cuenta a la hora de realizar el diseño, el siguiente paso consiste en plasmar todos estos criterios en las piezas que compondrán el microscopio “real”. Para ello el paso previo consiste en realizar las piezas por medio de un programa informático específico para el diseño de piezas mecánicas. Además de la realización de las piezas y la obtención de los planos de cada una de ellas, el programa permite simular el montaje del conjunto de las piezas. Esto es de gran utilidad, para un equipo con la complejidad del sistema combinado que hemos desarrollado, ya que permite comprobar tanto que las piezas ensamblan correctamente unas con otras, como que el sistema cumple con los requisitos deseados antes de realizar el mecanizado de las piezas en el taller. Esta visualización del equipo antes de su realización física es fundamental para reducir los posibles errores en el diseño.

Como ya se ha mencionado anteriormente, durante la realización de la tesis se han desarrollado dos microscopios de campo cercano. En este capítulo nos centraremos en los detalles del primer prototipo (SFM-1) cuya finalidad radica en comprobar que el diseño y los componentes empleados son adecuados y que el microscopio funciona correctamente. En la figura 3.3 se puede ver el SFM-1 finalizado, una vez se han ensamblado todas las piezas y se ha montado sobre un microscopio óptico invertido.



Figura 3.3. Imagen del primer SFM construido montado sobre el microscopio óptico Axiovert 100A de la marca Zeiss.

Este primer prototipo consta de unas plataformas, que por medio de un sistema de guías y unos tornillos micrométricos, desplaza el microscopio en el plano de la muestra, permitiendo centrar la punta en el eje óptico del MO, es lo que llamamos **mesa XY**. En ella se sitúa el sistema de barrido (*xyz*) y solidario a éste, la muestra. Sobre la mesa XY se sitúa una plataforma que se desplaza en el eje vertical o **mesa Z**, a la que se fija el portapuntas y el **sistema de detección** que va solidario a la micropalanca. En la figura 3.4 se muestra un corte transversal del SFM en el que se pueden apreciar las diferentes partes mencionadas anteriormente, coloreadas en gris claro, gris oscuro y beige, respectivamente, para facilitar su identificación.

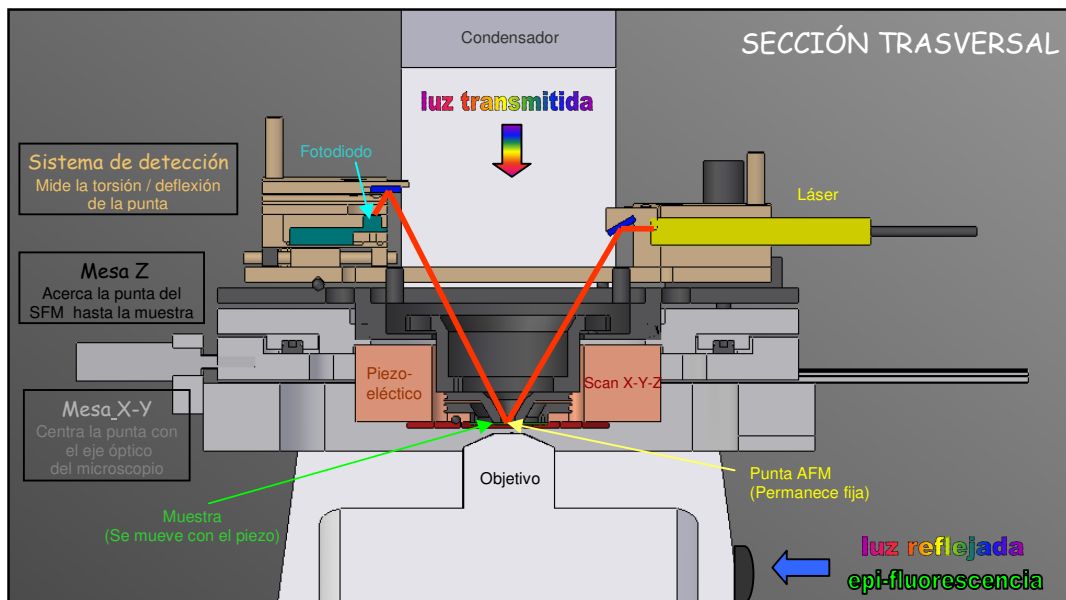


Figura 3.4. Corte transversal del diseño del primer SFM situado sobre un microscopio óptico invertido. Como se muestra en la figura, las piezas de color gris claro corresponden a la mesa XY, las piezas de color gris oscuro a la mesa Z y las piezas de color beige al sistema de detección.

A continuación veremos las distintas partes por separado:

3.2.1 Mesa XY

La *mesa XY* sostiene todo el sistema SFM y su función consiste en situar la punta en el eje óptico del microscopio invertido. En la figura 3.5 podemos ver a la izquierda los principales componentes que constituyen esta parte del SFM separados para que puedan apreciarse independientemente y a la derecha como queda el conjunto una vez montado.

La *mesa X* se fija al MO en el lugar de la platina. La *mesa Y* se ensambla a la *mesa X* por medio de guías lineales, del mismo modo que la *base del piezoeléctrico* a

la *mesa Y*. En la pieza inferior se sitúa la guía lineal y en la superior los carriles que se desplazan a lo largo de dicha guía. Cada uno de éstos conjuntos de guías permite el movimiento del SFM en una dirección del plano de la muestra. Por último el *piezoeléctrico* va atornillado desde abajo a la *base del piezoeléctrico*.

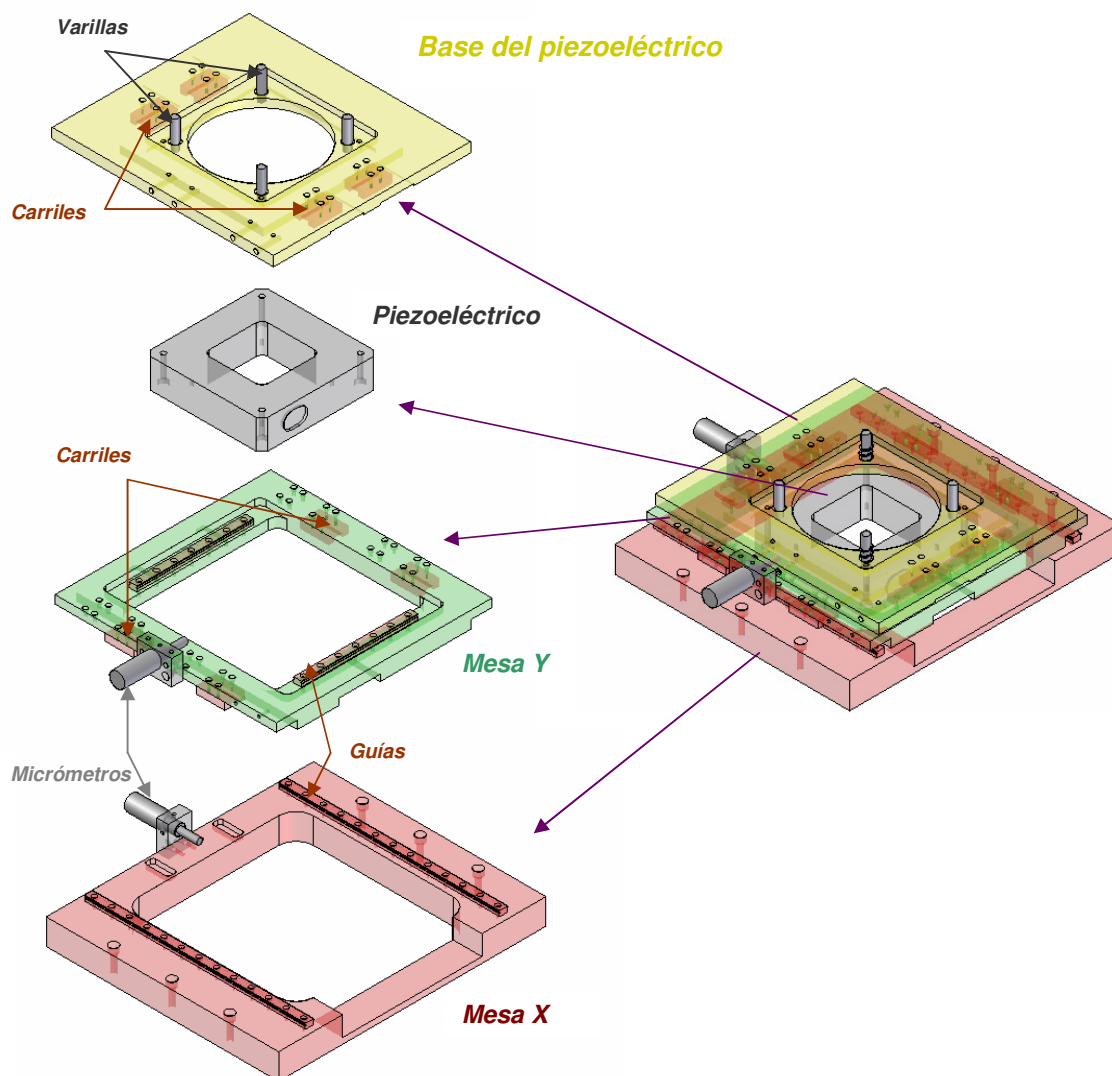


Figura 3.5. A la izquierda se muestra el desglose de las piezas que conforman la mesa XY y el sistema de barrido del primer prototipo. A la derecha se puede ver el conjunto montado.

En la figura 3.5 no se han incluido las piezas que permiten sujetar la muestra al *piezoeléctrico*, por su reducido tamaño comparadas con el resto de componentes y por que hay un juego de piezas diferente para cada sistema de barrido. En la figura 3.6 se muestran los diseños de ambos conjuntos, donde podemos apreciar que por la parte inferior del *piezoeléctrico* se atornilla la *base del portamuestras* si se utiliza el *piezo XYZ* y al *portapiezos Z* en el caso del *piezo XY*.

El **piezo XYZ** permite desplazar la muestra $30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$ en xy y $10\ \mu\text{m}$ en z (P-733.3DD), mientras que el **piezo XY** (P-733.2CD) permite barrer $100\ \mu\text{m}$ en los ejes xy, con lo que hay que incorporar aparte el barrido en z. Esto se ha realizado por medio de 3 piezoeléctricos P-810.10 distribuidos como se ve en la parte derecha de la figura 3.6.

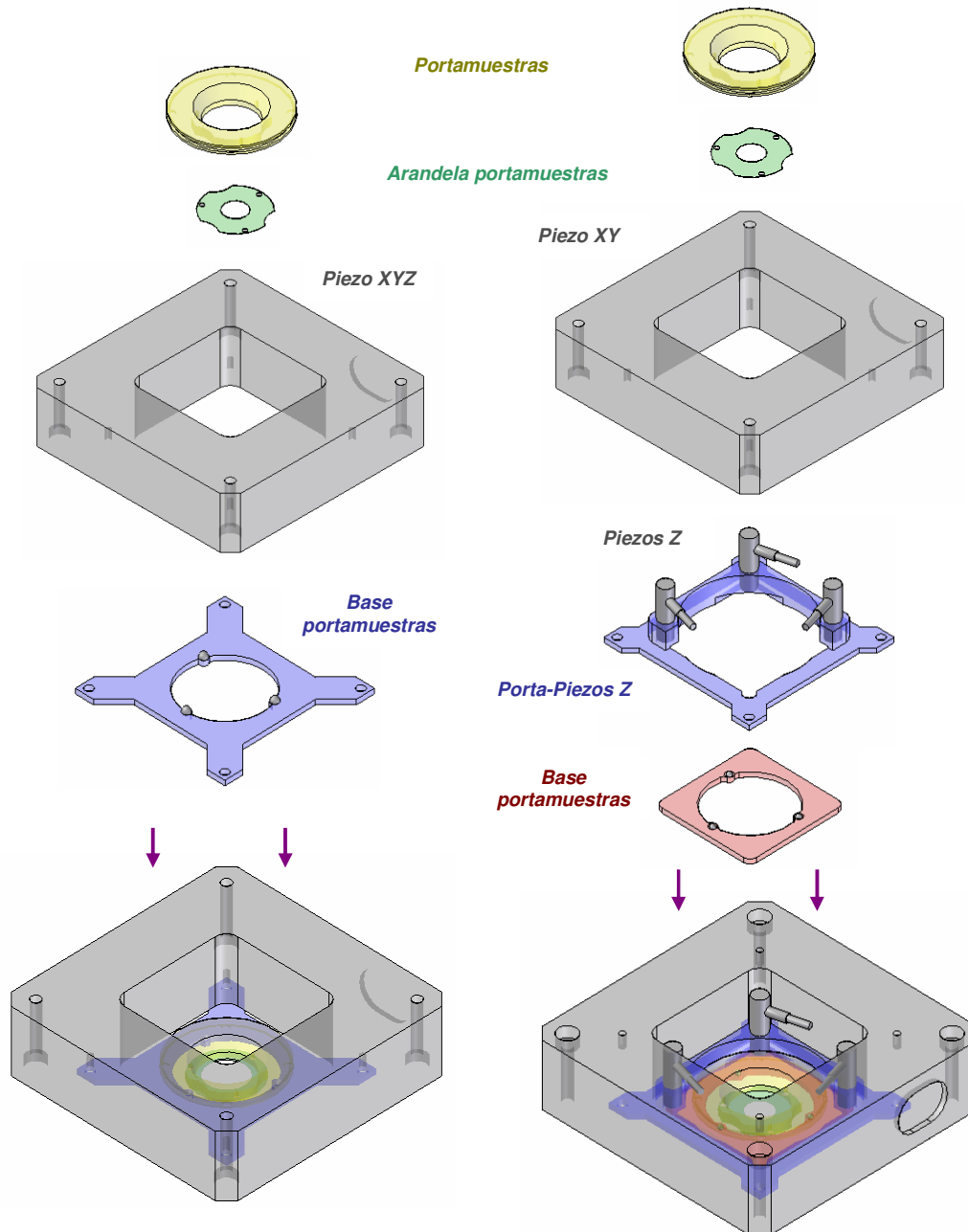


Figura 3.6. La parte izquierda corresponde al diseño con el piezoeléctrico P-733.3DD que realiza el barrido en xyz, mientras que a la derecha se muestra el montaje para el sistema de barrido en xy P-733.2CD y los tres piezoeléctricos PI-810.10 que realizan el desplazamiento en z. En ambos casos se muestra el conjunto montado sobre el piezoeléctrico en la imagen inferior y las piezas que lo componen en la parte superior.

Este diseño no incorpora una mesa XY que permita desplazar la muestra respecto a la punta para poder elegir la zona de medida, puesto que se esperaba realizar este movimiento de manera inercial con el piezoeléctrico, esto es, hacer oscilar el sistema de barrido aplicando un voltaje intermitente para desplazar “a pasos” la muestra que está sobre él en cualquiera de las cuatro direcciones del plano (+x, -x, +y, -y). Sin embargo, este sistema no resultó efectivo, ya que para que se desplazara la muestra era necesario aplicar voltajes muy elevados que podían dañar el piezoeléctrico.

El **portamuestras** se coloca desde arriba sobre la **base portamuestras** por medio de imanes y apoya sobre las bolas situadas en el **portamuestras** para que la posición no quede inestable sino definida por un plano. El sustrato sobre el que se deposita la muestra (vidrio cubreobjetos, mica, ITO...) se sitúa entre el **portamuestras** y la **arandela portamuestras**. Ambas piezas se atornillan manteniendo el sustrato fijo entre ellas.

3.2.2 Mesa Z

La mesa Z es la encargada de variar la posición relativa entre punta y muestra, alejando o acercando la punta en el eje vertical. Esto se realiza por medio de unos tornillos micrométricos sujetos a la **mesa Z** que apoyan en la **base del piezoeléctrico** situada en el conjunto de la **mesa XY**. Este movimiento vertical va guiado por medio de las **varillas** ancladas en la **base del piezoeléctrico** (figura 3.5) y de las **abrazaderas** ancladas en la **mesa Z**, de esta forma se desplazan una respecto a la otra. Además las **abrazaderas** permiten fijar la **mesa Z** a las **varillas** cuando la punta está cerca de la muestra. En ese momento se puede quitar el apoyo de los **tornillos micrométricos** lo que confiere mayor estabilidad al SFM. Para que la punta se mueva solidaria con el movimiento vertical, la **base portapuntas** se sujeta a la **mesa Z** por medio de imanes para que resulte fácil su colocación y extracción cuando haya que cambiar la punta. Además de por los imanes la posición entre ambas piezas queda definida por medio de bolas en una de las piezas y por los alojamientos correspondientes en la otra. La punta se fija a la parte inferior del **portapuntas** con grasa de vacío, pintura de plata o cualquier tipo de pegamento o sujeción.

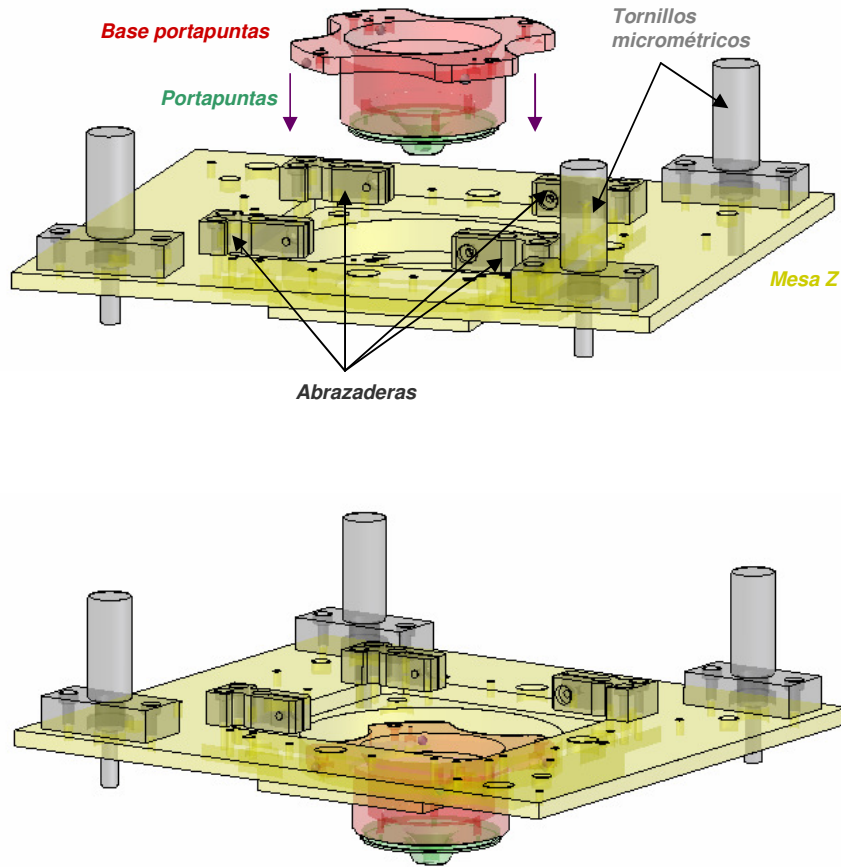


Figura 3.7. Esquema de la *mesa Z*. En la parte superior se muestran los componentes y la colocación del *portapuntas* y la *base portapuntas* desde arriba. En la parte inferior de la figura se muestra el conjunto montado.

3.2.3 Sistema de detección

El sistema de detección como ya vimos en la descripción de los componentes del SFM en el capítulo 2, es el encargado de detectar la interacción entre punta y muestra por medio de la deflexión de la micropalanca. En este equipo empleamos un sistema por *deflexión de haz* o *beam deflection*, en el que se hace incidir un láser sobre la micropalanca que se refleja y llega a un fotodiodo con cuatro cuadrantes. Por medio de la flexión y torsión de la micropalanca varía la posición en la que incide el haz sobre el fotodiodo, de manera que se puede determinar la fuerza que actúa sobre la punta del SFM. En la figura 3.8 se muestra el diseño del sistema de detección de este primer prototipo. El haz láser incide en un **espejo** colocado a 30 grados respecto a la horizontal y por medio de unos **tornillos micrométricos** que mueven dicho **espejo**, se hace incidir el haz en el extremo de la micropalanca. El **fotodiodo** está

situado sobre unas bases que permiten un desplazamiento grueso de manera que el haz reflejado por la micropalanca llegue al fotodiodo tras reflejarse en un **espejo** situado horizontalmente sobre él. El ajuste fino para situar el haz reflejado en el centro del **fotodiodo** se realiza por medio de unos **tornillos micrométricos** que actúan sobre el **espejo**.

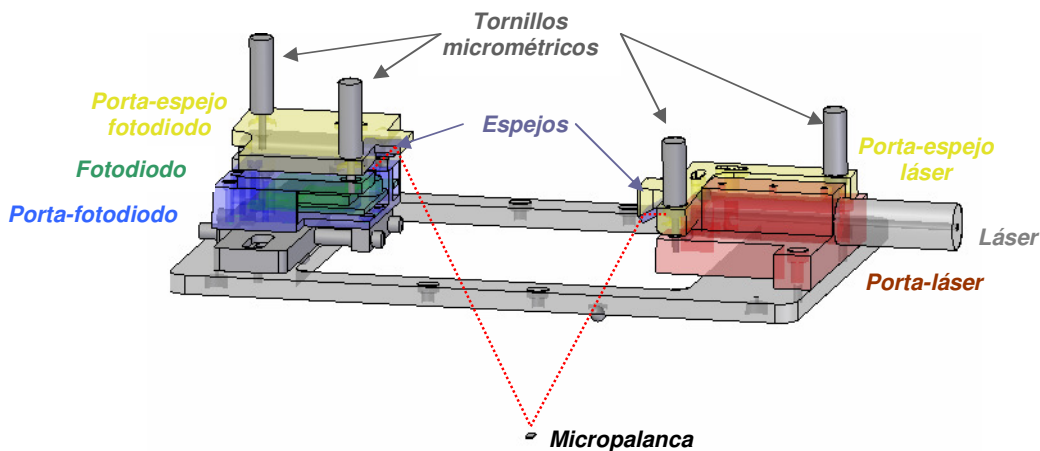


Figura 3.8. Esquema del sistema de detección y del camino óptico del láser (línea roja punteada). El haz láser se refleja en un espejo que lo desvía hacia la micropalanca, tras reflejarse en ésta incide en otro espejo que lo desvía hacia el fotodiodo.

Se ha utilizado un diodo láser con una longitud de onda de 635 nm, una distancia focal de 70 mm y un diámetro de haz en el foco de 30 micras aproximadamente [Schäfter-Kirchhoff]. El fotodiodo utilizado es el modelo S4349 [Hamamatsu] de silicio PIN (unión p-n con un material intrínseco entre ellos), dividido en cuatro cuadrantes, tiene su máxima respuesta espectral entorno a 700 nm y una alta velocidad de respuesta (20 MHz).

Al unir las partes anteriormente descritas obtenemos el montaje del SFM completo y al fijarlo al microscopio óptico tenemos el microscopio combinado, como se puede ver en la figura 3.9.

Una vez comprobado el correcto ensamblaje de las piezas con el programa informático, obtenemos los planos con las cotas para cada pieza, éstos planos se llevan al taller para su fabricación. Las piezas del SFM-1 se han fabricado en el taller mecánico del Servicio General de Apoyo a la Investigación Experimental (SEGAINVEX) de la Universidad Autónoma de Madrid. Una vez que el taller finaliza y

nos entrega las piezas procedemos al montaje del equipo y a probar la funcionalidad del mismo.

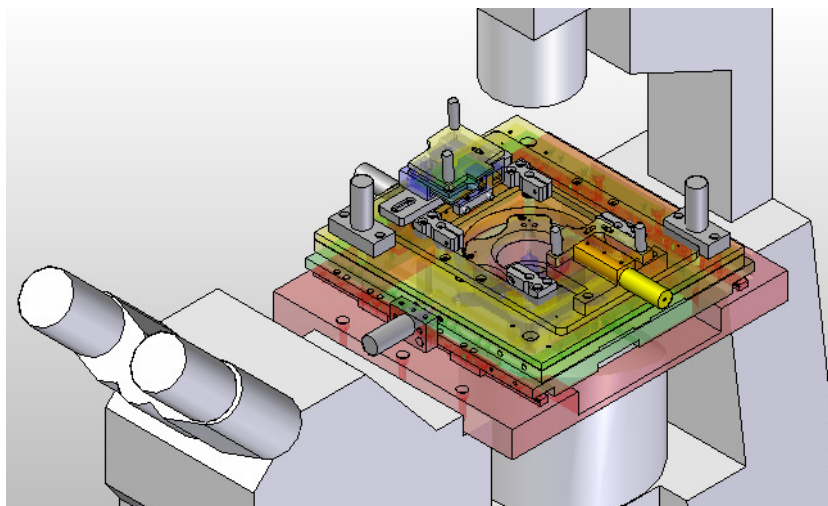


Figura 3.9. Montaje completo del SFM-1 sobre el microscopio óptico

Durante el tiempo que invierte el taller en mecanizar las piezas se aprovecha para equipar el microscopio óptico Axiovert 100 A de Zeiss con los componentes necesarios para poder emplear las técnicas ópticas descritas en el apartado 2.1.5. Los componentes que se adquieren y se montan son: un objetivo con anillo de fases para medir en contraste de fases; un condensador de DIC, un prisma Wollaston y un polarizador [Zeiss] para medir en contraste interferencial; y por último para poder realizar medidas de fluorescencia, una lámpara LED [CoolLED] con las longitudes de onda de los principales fluoróforos utilizados (400 nm para DAPI, 465 nm para fluoresceína y proteína verde fluorescente (GFP) y 525 nm para rodamina), los filtros de excitación, dicróicos y de emisión específicos para cada LED [omega filters] y una cámara CCD de alta sensibilidad para las imágenes de intensidad reducida [Hamamatsu]. De esta forma queda preparado el microscopio óptico para realizar los experimentos combinados en cuanto se ensamble el SFM y se sitúe sobre él.

3.3 Puesta a punto: Resultados y medidas

Una vez que el microscopio combinado está montado hay que confirmar el correcto funcionamiento del SFM-1 tanto como microscopio de fuerzas aislado como cuando se combina con técnicas ópticas durante su funcionamiento. Para ello se han realizado unas primeras medidas que también nos permitirán detectar cuales son los

inconvenientes o problemas que puedan surgir en el funcionamiento y manejo del equipo y de esta forma sabremos que mejoras debemos incorporar en el equipo con el fin de solucionarlos.

El primer paso para poner el marcha el SFM consiste en calibrar los sistemas piezoeléctricos para que los tamaños de las imágenes correspondan con el tamaño real que deben tener. Una vez calibrado, se ha confirmado su funcionalidad realizando medidas en los diferentes modos de trabajo descritos en el capítulo 1: modo contacto, modo dinámico en modulación de amplitud (AM-DSFM) y modo de salto o *jumping*. También se han realizado medidas tanto en aire como en medio líquido. Posteriormente, para verificar la viabilidad del sistema combinado se han adquirido imágenes ópticas junto con las de SFM. Por último, una vez que el sistema está puesto a punto y completamente operativo, se ha implementado la técnica KPM en el SFM. Combinando esta técnica con técnicas ópticas ha sido posible estudiar fenómenos electrónicos fotoinducidos en materiales con aplicaciones optoelectrónicas.

3.3.1 Calibración del sistema de barrido

Para calibrar los sistemas piezoeléctricos que realizan el desplazamiento de la muestra en los tres ejes debemos conocer cuántos nanómetros se desplaza para cada voltio aplicado. Además estas primeras imágenes de calibración permiten obtener información simultánea de la calidad de la imagen de SFM y de la estabilidad del microscopio combinado. El sistema de barrido funciona adecuadamente si realiza el desplazamiento de manera uniforme a lo largo de toda la imagen y muestra las líneas rectas del patrón de calibración sin ondulaciones o deformaciones.

Antes de conocer los valores de calibración para cada piezoeléctrico, introducimos en el programa de medida WSxM [Nanotec] los valores teóricos esperados en cada caso, que se calculan de la relación de nanómetros totales que puede mover cada sistema de barrido entre el rango total de voltaje que se puede aplicar para su funcionamiento. Una vez que se han adquirido las imágenes se obtienen a partir de las dimensiones conocidas del patrón medido, los valores reales de calibración que hacen que las dimensiones de la imagen correspondan con las dimensiones que tiene dicho patrón. Posteriormente se corrige el valor teórico introducido en el programa informático por el valor real en nm/V que realiza cada piezoeléctrico. En la figura 3.10, se muestran las imágenes adquiridas de dos redes de

calibración y un perfil obtenido de cada imagen. La primera de ellas es una red triangular con una altura de $1.8 \mu\text{m}$ y un periodo de $3 \mu\text{m}$. La segunda es una red cuadrada de 17.9 nm de altura y $3 \mu\text{m}$ de periodo. De las dimensiones en la dirección de barrido como de la altura obtenemos los valores reales de calibración para cada sistema de piezoeléctrico.

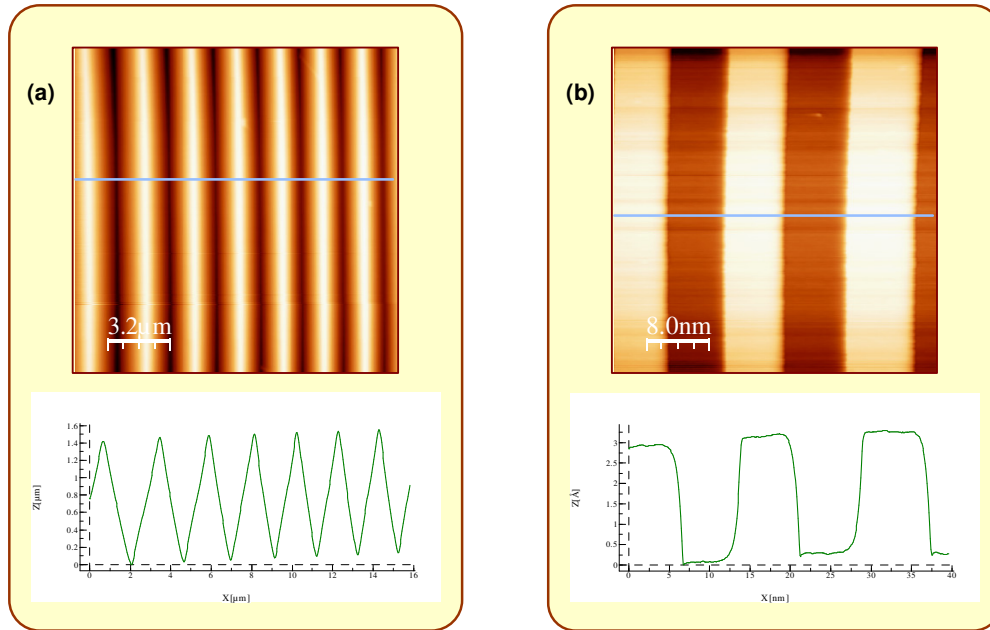


Figura 3.10. Imágenes de topografía de dos redes de calibración. **(a)** Imagen de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ de una red triangular con un periodo de $3 \mu\text{m}$ y una altura de $1,8 \mu\text{m}$. **(b)** Imagen de $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ de una red cuadrada con un periodo de $3 \mu\text{m}$ y una altura de 17.9 nm . La línea azul que aparece en cada imagen corresponde al perfil mostrado en la parte inferior. En la imagen (b) La escala que aparece en el perfil no corresponde con las medidas reales ya que aún no se habían obtenido los valores de calibración correctos.

3.3.2 Medidas en diferentes modos y diferentes ambientes

Para que nuestro SFM sea completamente funcional hay que comprobar que es posible operar el SFM en los distintos modos de medida así como en diferentes medios, tanto en aire como en líquidos. De esta forma, confirmamos que nuestro SFM es una herramienta versátil que puede ser aplicada tanto en estudios de Física del Estado Sólido como en experimentos con muestras biológicas.

En primer lugar se han adquirido imágenes en modo contacto, modo dinámico y modo jumping de muestras con baja rugosidad y por tanto una escala pequeña en z y muestras con una elevada rugosidad para comprobar el funcionamiento en ambos

rangos de barrido en z. En la figura 3.11 se han medido láminas delgadas de P3OT en aire que presentan baja topografía y posteriormente fibroblastos que presentan mayor rugosidad. Para estas medidas se han utilizado puntas de silicio con una constante de fuerzas de 2N/m y una frecuencia de resonancia de 75 kHz [Olympus]

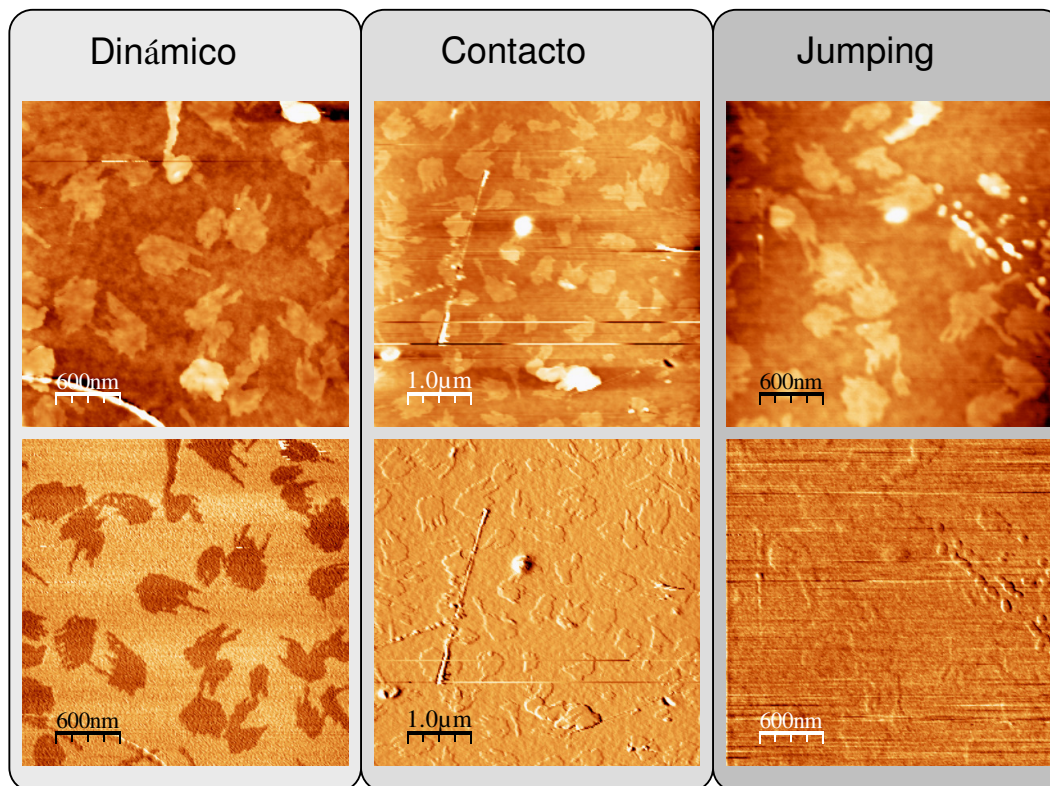


Figura 3.11. Imágenes de topografía (arriba) y de la señal de error del sistema de retroalimentación en el modo contacto y jumping y señal de frecuencia en modo dinámico en modulación de amplitud (abajo) de láminas delgadas de P3OT sobre vidrio.

En la figura 3.12 se muestran imágenes de fibroblastos depositados sobre vidrio y fijados con glutaraldehído medidos en aire en modo contacto y dinámico.

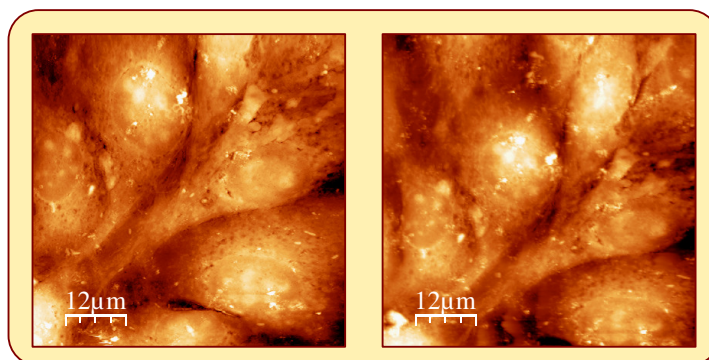


Figura 3.12. Imagen de fibroblastos de topografía (arriba) y señal error del sistema de retroalimentación (abajo) medidas en aire en modo contacto (a) y en modo dinámico AM-DSFM (b).

En la figura 3.13 se muestran imágenes de fibroblastos medidas en la misma zona con los tres modos de medida.

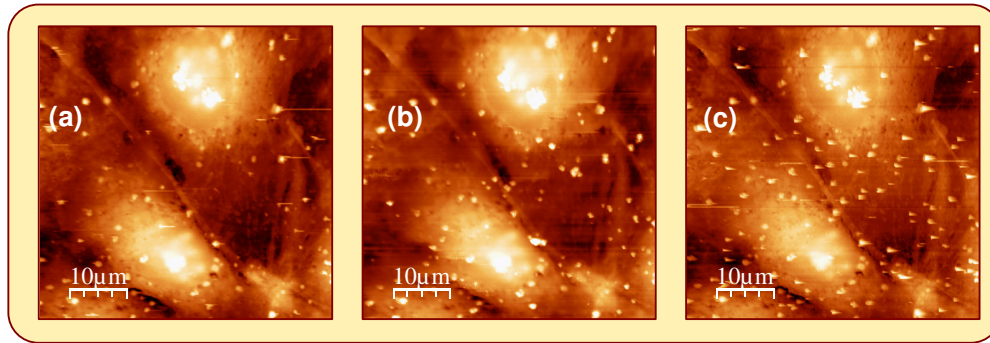


Figura 3.13. Imágenes de topografía de fibroblastos medidos en modo contacto (a), en modo AM-DSFM (b) y en modo jumping (c).

Por último, en la figura 3.14 se muestran imágenes de fibroblastos medidas en medio líquido en modo contacto (izquierda) y en modo dinámico AM-DSFM (derecha).

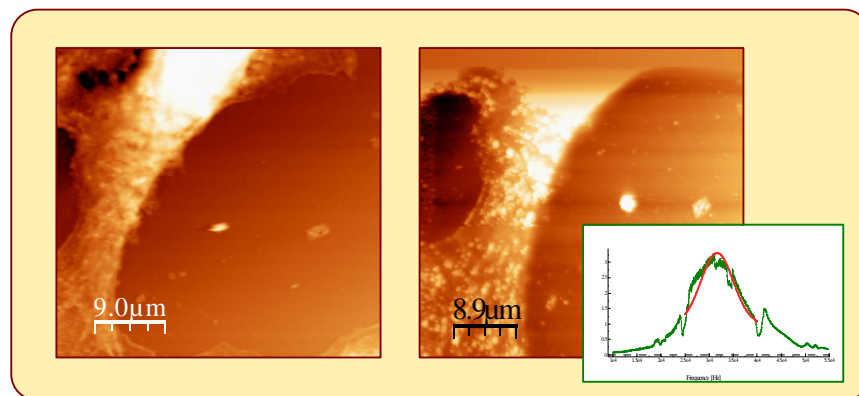


Figura 3.14. Imagen de fibroblastos medidos en agua en modo contacto (izquierda) y en modo dinámico (derecha). El gráfico insertado en la figura corresponde al barrido en frecuencias que realiza el programa informático para encontrar la frecuencia de resonancia de la micropalanca. El pico máximo de la curva se sitúa en 32 kHz.

Durante la realización de las medidas de fibroblastos tanto al aire como en líquido se han adquirido curvas de fuerza frente a distancia (FZ) para comprobar la correcta obtención de las mismas y caracterizar las diferencias entre ambas. La figura 3.15 (a) muestra una curva característica FZ adquirida en aire. En ella se puede observar el salto al contacto y la gran adhesión que existe entre punta y muestra. La curva FZ de la figura 3.15 (b) se ha adquirido en agua. En este caso se aprecia que no

tiene lugar el salto al contacto y la adhesión entre punta y muestra es aproximadamente cuatro veces menor que la obtenida en aire.

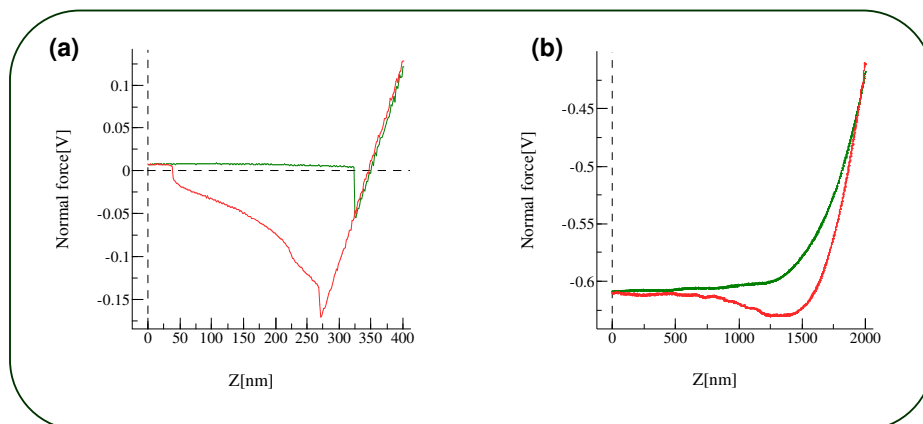


Figura 3.15. Curvas de fuerza frente a distancia sobre fibroblastos (a) medida en aire y (b) medida en medio líquido. En la primera se puede ver el salto al contacto y la gran adhesión que presenta. En la segunda no hay salto al contacto y la adhesión es unas cuatro veces menor.

3.3.3 Medidas combinadas

Una vez se ha comprobado el correcto funcionamiento del SFM-1. El siguiente paso consiste en probar la funcionalidad de ambos equipos de manera combinada. Para ello se han medido muestras de diferentes tamaños y alturas, con diversos modos de medida y varias técnicas ópticas.

En primer lugar se muestran dos micrografías ópticas adquiridas en transmisión durante el funcionamiento del SFM con dos muestras y dos micropalanca distintas (figura 3.16). Estas imágenes resultan de utilidad para comprobar que la punta del SFM se encuentra en el plano de la muestra, para situarnos en una zona determinada o para observar el correcto movimiento del sistema piezoeléctrico. En ambas imágenes se puede apreciar la muestra y la sombra de la micropalanca con el láser incidiendo cerca de su extremo libre. La imagen de la izquierda se ha adquirido en contraste de fases y corresponde a una lámina delgada de un polímero conductor poli (3-octiltiofeno) (P3OT), la micropalanca que se observa tiene 225 μm de largo y 28 μm de ancho ($k= 3 \text{ N/m}$ y $\text{frec}_{\text{resonancia}}= 75 \text{ KHz}$) [BudgetSensors]. La imagen de la derecha se ha adquirido en campo oscuro y corresponde a una muestra de fibroblastos (células que mantienen la matriz extracelular de los tejidos de muchos animales) sobre vidrio fijados con glutaraldehído. En esta imagen se observan dos micropalanca, sobre la

que está focalizado el láser tiene $200\ \mu\text{m}$ de largo y $20\ \mu\text{m}$ de ancho ($k=0,05\ \text{N/m}$ y $\text{frec}_{\text{resonancia}}=19\ \text{KHz}$) [Olympus] y la otra micropalanca tiene $100\ \mu\text{m}$ de largo y $20\ \mu\text{m}$ de ancho. En ambas imágenes se ha utilizado un filtro verde, que por un lado mejora la calidad de la imagen al evitar la aberración cromática y por otro lado facilita la observación ya que ésta es la radiación más sensible al ojo humano.

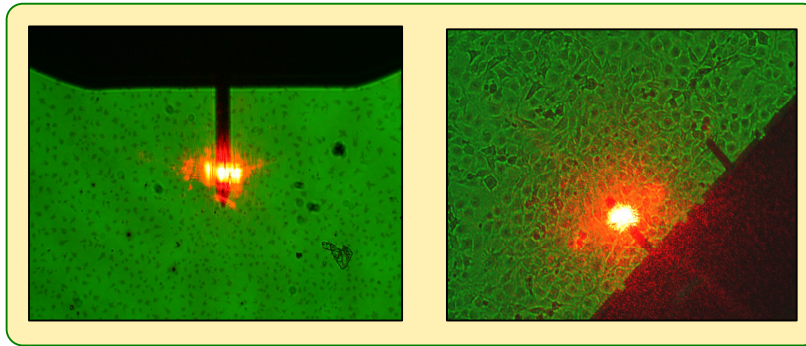


Figura 3.16. Micrografías ópticas adquiridas en transmisión durante el funcionamiento del SFM. En ambas imágenes se observa la muestra y la sombra de las micropalancas con el láser incidiendo cerca de su extremo libre. A la izquierda la imagen óptica de $690\ \mu\text{m} \times 475\ \mu\text{m}$ en contraste de fases de P3OT y a la derecha imagen de $1\ \text{mm} \times 750\ \mu\text{m}$ de fibroblastos en campo oscuro.

Como los patrones de calibración del sistema piezoeléctrico utilizados en el apartado 3.3.1 son de silicio y por tanto no son transparentes, no es posible realizar una medida combinada de SFM y microscopía óptica. Sin embargo esta medida se puede adquirir utilizando una red lineal de difracción óptica, que permite caracterizar la topografía de la muestra con el SFM (figura 3.17 (a)) y a la vez obtener la correspondiente imagen óptica (figura 3.17 (b)). Para adquirir la micrografía de la figura 3.17 (b) se ha utilizado el microscopio Axiovert 100A de la marca Zeiss, un objetivo de 50x y un filtro verde.

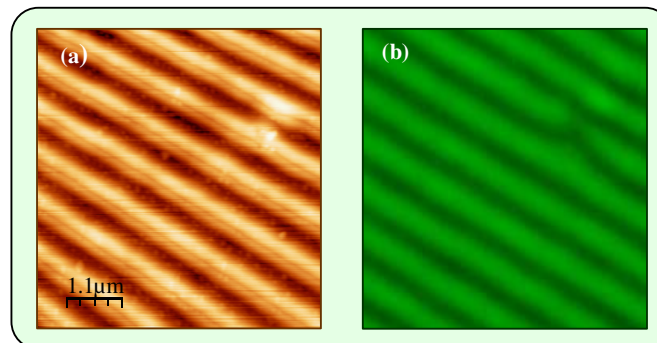


Figura 3.17. (a) Imagen de topografía adquirida en modo contacto de una red lineal de difracción óptica. (b) Micrografía óptica de campo oscuro de la misma zona que en la imagen (a) tomada con el microscopio Axiovert 100A de Zeiss y el objetivo de 50x.

A continuación se han adquirido imágenes de SFM y micrografías ópticas. En el primer caso se han medido láminas delgadas de P3OT sobre vidrio depositadas por centrifugación o *spin coating* a partir de una disolución en cloroformo (40mg/ml) (figura 3.18). La altura característica de estas muestras está entorno a 10 nm. La figura 3.18 (a) corresponde a una imagen de topografía de P3OT adquirida en modo jumping mientras que la imagen de la figura 3.18 (c) se ha adquirido en el modo dinámico AM-DSFM. La micrografía de la figura 3.18 (b) se ha medido en contraste de fases y la figura 3.18 (d) en contraste interferencial o DIC.

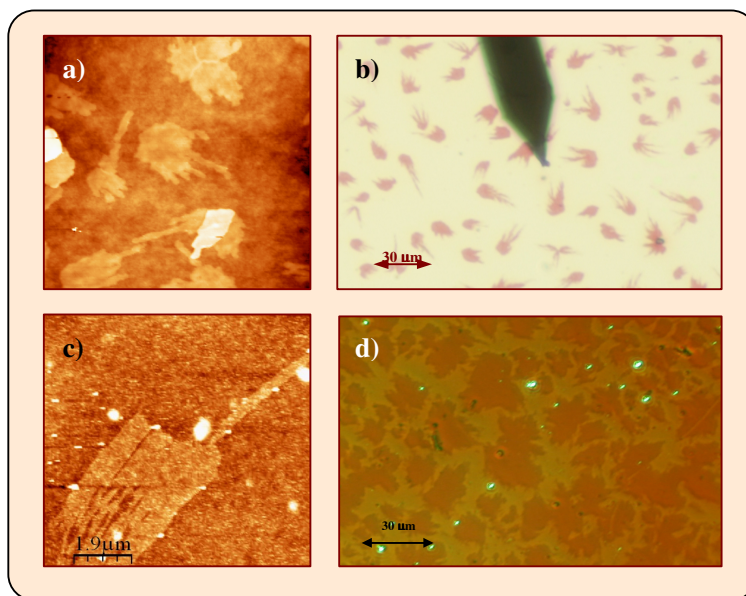


Figura 3.18. Imágenes del polímero conductor poli-3(octiltiofeno). **(a)** Topografía en modo jumping. **(b)** Micrografía óptica en **contraste de fases** con un aumento de 30x. Al tratarse de una técnica de luz transmitida se puede ver la sombra de la micropalanca. Se ha apagado el láser del sistema de detección del SFM para realizar la micrografía. **(c)** Topografía en **modo AM-DSFM**. **(d)** Imagen óptica en **contraste interferencial o DIC** con un aumento de 50x. Ambas imágenes ópticas (c) y (d) se han adquirido con el microscopio óptico Nikon TE2000E.

Para las medidas de muestras con mayor rugosidad se han adquirido imágenes de fibroblastos marcados con GFP o proteína verde fluorescente (del inglés *Green Fluorescent Protein*) depositados sobre vidrio y fijados con glutaraldehído (figura 3.19). La altura característica de estas muestras está en el rango de la micra. La figura 3.19 (a) muestra una imagen de topografía de SFM en modo contacto y la figura 3.19 (b) una micrografía de fluorescencia de fibroblastos marcados con GFP. Esta proteína absorbe en una longitud de onda centrada entorno a 475 nm y emite en 509 nm. La figura 3.19 (c) corresponde a una imagen de fibroblastos medida en medio líquido en

modo contacto y la figura 3.19 (d) es una micrografía de la misma zona que la figura 3.19 (c) medida en campo oscuro con un objetivo de 50x.

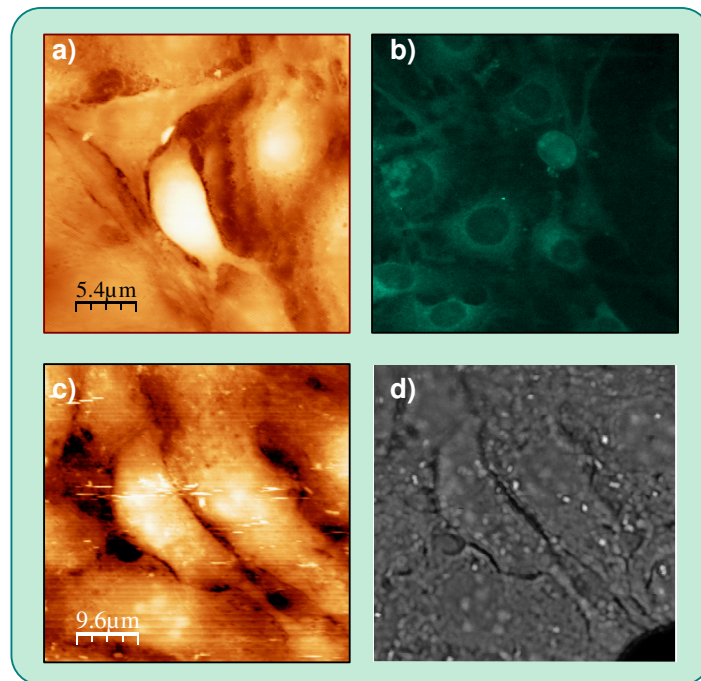


Figura 3.19. **a)** Imagen de topografía de fibroblastos adquirida en modo contacto. **b)** Imagen de fluorescencia de fibroblastos marcados con GFP. El tamaño de la imagen es de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. **c)** Imagen de topografía de fibroblastos medida en modo contacto en medio líquido. **d)** Micrografía óptica en campo oscuro de la misma zona que la imagen c). El tamaño de la imagen es de $48 \times 48 \mu\text{m}^2$.

3.3.4 Medidas KPM combinadas con microscopía óptica

Una vez que el SFM-1 combinado se ha puesto a punto, ya está plenamente operativo. Ya se discutió en el capítulo 2 que una de las grandes ventajas del SFM es que no solo permite obtener imágenes topográficas con resolución nanométrica sino que es posible adquirir otras señales que nos dan información sobre las propiedades físicas y químicas de la muestra. En nuestro equipo combinado, su gran potencial reside en que a la vez que se mide con el SFM es posible, por un lado iluminar la muestra de forma controlada, y de esta forma fotoinducir cambios a escala nanométrica. Por otro lado, es posible medir simultáneamente diferentes propiedades ópticas y de esta forma establecer una correlación entre las propiedades nanoscópicas y las propiedades ópticas.

En nuestro caso, el interés se ha centrado en el estudio de los procesos electrónicos fotoinducidos, esto es, generación, redistribución, relajación de carga, etc que determinan el funcionamiento de los dispositivos optoelectrónicos modernos. Estos fenómenos incluyen tanto procesos reversibles como procesos de degradación. Para ello se ha implementado la técnica KPM en el SFM-1 según se explicó en el capítulo 2.

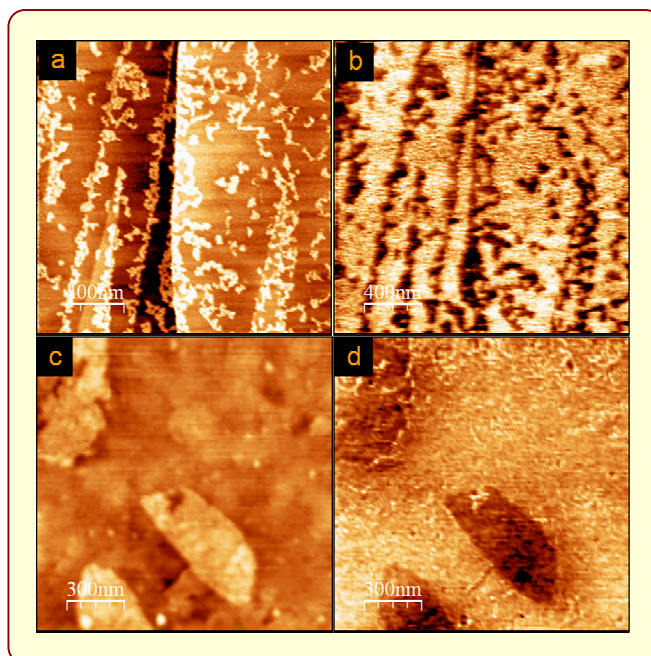


Figura 3.20. a) y c) imágenes de topografía y b) y d) de potencial de contacto, adquiridas en una muestra de a) y b) avidina depositada sobre HOPG y c) y d) bacteriorodopsina sobre ITO ultraplano. La escala en z es a) 5nm b) 200 mV c) 10nm d) 100 mV.

En la figura 3.20 se pueden ver imágenes de topografía y potencial de contacto de proteínas adquiridas con el SFM-1. Las figuras 3.20 (a) y (b) corresponden a una muestra de avidina (10 $\mu\text{g/ml}$) depositada sobre grafito y la figuras 3.20 (c) y (d) a una muestra de bacteriorodopsina depositada sobre ITO ultraplano. En estas imágenes se aprecia que tanto la resolución lateral (30-50 nm) como la resolución en z (20-40 mV) es similar a la que se encuentra en un microscopio KPM convencional en las mismas condiciones de medida [Palacios-Lidón2009].

Ya que el objetivo de esta sección es resaltar las capacidades de nuestro sistema combinado, a continuación solo mostraremos un ejemplo de un experimento en el que se utiliza la iluminación externa para inducir cambios el potencial de contacto cuando diferentes láminas delgadas de polímeros conductores (P3OT y MEH-PPV)

son iluminados con luz blanca sin entrar en detalles experimentales o discusiones científicas de los procesos que están teniendo lugar. Dicha discusión se llevará a cabo en el capítulo 5.

En la figura 3.21 se aprecia que al iluminar con luz blanca el potencial de contacto del P3OT se desplaza ligeramente hacia valores más pequeños mientras que en el MEH-PPV se desplaza hacia valores mayores respecto al valor de potencial de contacto que presentan los polímeros en oscuridad. El hecho de que el potencial de contacto de diferentes materiales responda de forma distinta tanto en valor absoluto como en signo a la iluminación, ya es una indicación cualitativa de que se están fotoinduciendo diferentes procesos electrónicos.

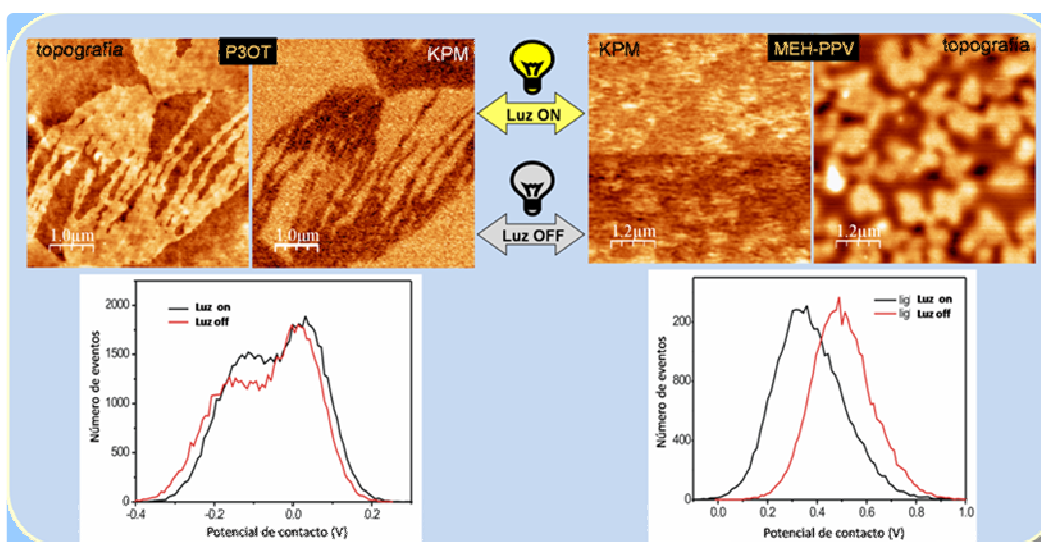


Figura 3.21. Imágenes de topografía y potencial de contacto obtenidas en láminas delgadas de P3OT (panel izquierdo) y MEH-PPV (panel derecho) preparadas sobre vidrio con contactos de oro a partir de una disolución de 40mg/ml en cloroformo. La mitad inferior de las imágenes se ha adquirido en oscuridad mientras que en la mitad superior la luz blanca se ha encendido. En la parte inferior se muestran los correspondientes histogramas donde se aprecia como al encender la luz el potencial de contacto se desplaza en diferente dirección dependiendo del polímero. La iluminación se realiza desde arriba.

Cuando ambos polímeros se mezclan para optimizar sus propiedades optoelectrónicas, encontramos que la topografía de la muestra resultante no se parece a ninguna de las muestras individuales (figura 3.22), presentando una estructura granular junto con grandes regiones lamelares. En este caso, para apreciar los efectos inducidos por la luz, esta no se enciende en mitad de una imagen sino que se toman dos imágenes consecutivas en la misma zona, la primera con la luz apagada y la siguiente con la luz encendida. De esta forma es posible restar ambas imágenes y

así obtener los cambios espaciales del potencial de contacto. En la figura 3.22 se puede apreciar que al iluminar, el potencial de contacto se desplaza hacia valores mayores aunque no todas las regiones se comportan de la misma forma: mientras que en la región lamelar apenas hay cambio, el potencial de contacto de la región granular se modifica considerablemente. Esto es debido probablemente a que ambos polímeros no se mezclan homogéneamente y sus concentraciones relativas son distintas dependiendo de la zona. Hay que notar que para poder restar ambas imágenes punto a punto, es imprescindible que el microscopio sea estable y que la deriva térmica entre imágenes sea despreciable.

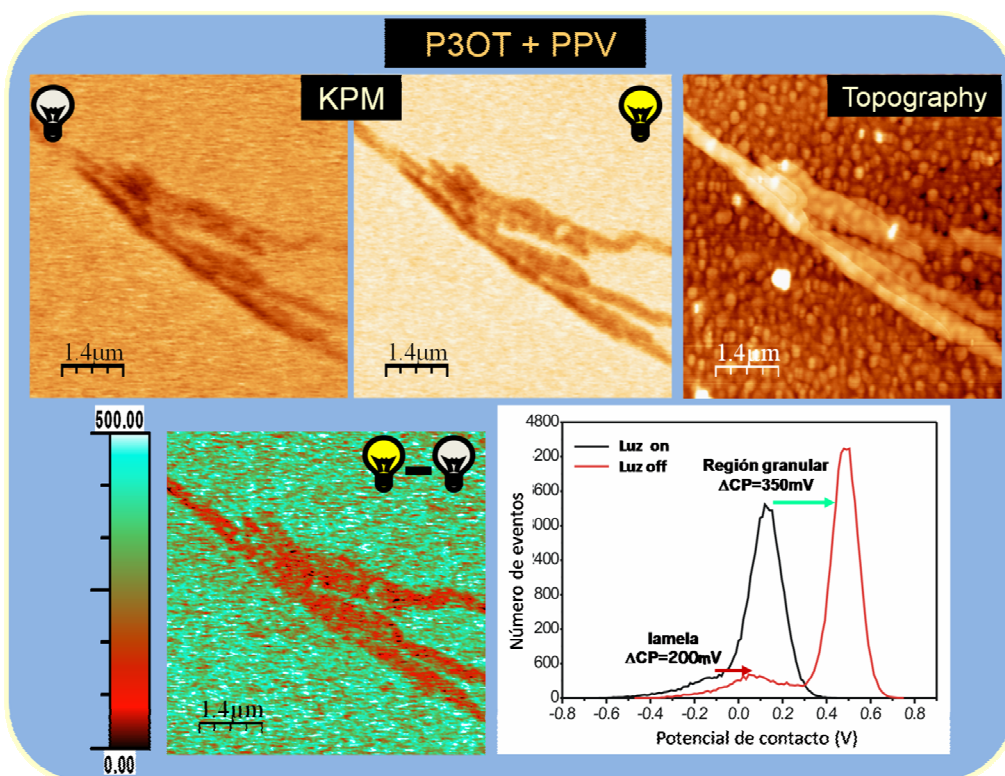


Figura 3.22. En la parte superior Imagen de CP con y sin iluminación e imagen de topografía. La imagen inferior corresponde a la resta de las imágenes de CP con y sin iluminación y el gráfico muestra el desplazamiento del CP al encender la luz tanto en el polímero de fondo como en la región lamelar.

Por último, otro experimento interesante que aporta una información relevante consiste en medir directamente la señal electrostática ESFM aplicando diferentes voltajes entre la punta y la muestra, en lugar de medir el potencial de contacto. Como se explicó en el capítulo 2, esta señal tiene la información sobre la capacidad del sistema punta-muestra [Perez-Garcia2008]. En la figura 3.23 se muestra como cambia la señal ESFM tanto en oscuridad como cuando la muestra es iluminada para diferentes voltajes entre punta y muestra.

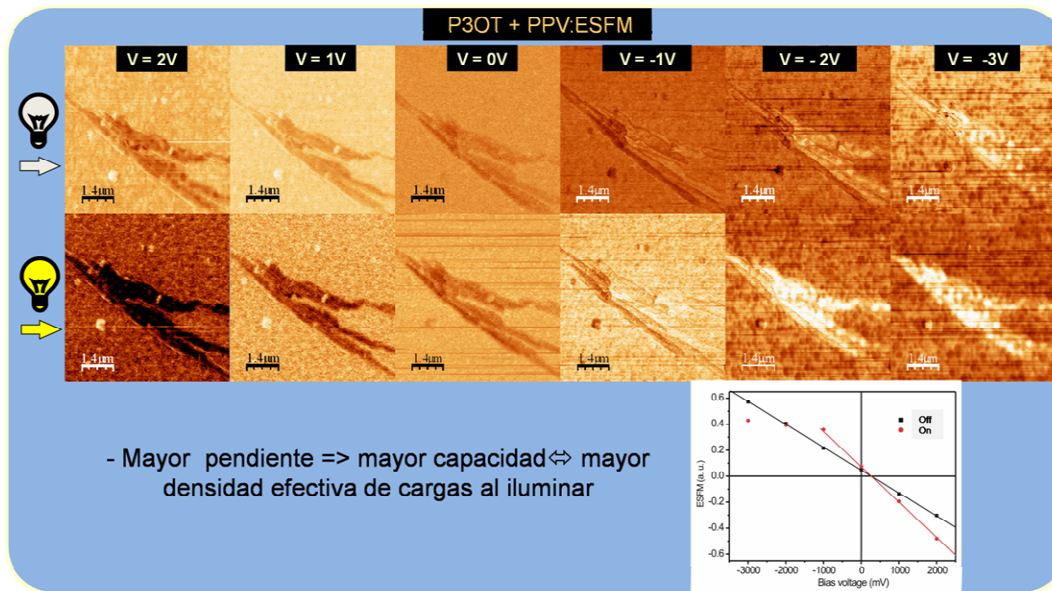


Figura 3.23. Imágenes de electrostática con y sin iluminación variando el voltaje aplicado desde 2V a -3V en rangos de 1V. En la gráfica de la parte inferior se puede ver como varía la pendiente en la recta de electrostática frente al voltaje aplicado.

El experimento anterior es solo un ejemplo de las posibles aplicaciones de nuestro sistema combinado en el estudio de procesos fotoinducidos. Para obtener resultados cuantitativos hay que realizar las medidas de forma metódica y analizar cuidadosamente los resultados. Mientras se desarrollaba el segundo prototipo que se describirá en el próximo capítulo, el SFM-1 ha seguido operativo en la Universidad de Murcia. A continuación se enumeran algunos resultados sin ahondar en los detalles científicos que han obtenido nuestros colaboradores en dicha universidad.

En estos experimentos el objetivo principal consiste en obtener resultados cuantitativos y de esta forma entender que procesos estaban teniendo lugar cuando los polímeros conductores se iluminan de forma controlada. Para ello se ha desarrollado un método particular de medida bautizado como “two pass method” (Figura 3.24) que consiste en adquirir dos imágenes simultáneas con y sin iluminación. Esto se realiza adquiriendo cada línea dos veces consecutivas, la primera sin iluminación y la segunda con iluminación. De este modo al finalizar la adquisición se obtiene una imagen sin iluminar correspondiente a la primera pasada de cada línea y otra imagen bajo irradiación correspondiente a la segunda pasada de cada línea.

Por otro lado, gran parte de los esfuerzos se han centrado en poder discriminar entre procesos fotofísicos reversibles y reacciones fotoquímicas irreversibles que degradan los materiales ya que normalmente estos procesos ocurren simultáneamente y están fuertemente correlacionados (Figura 3.25).

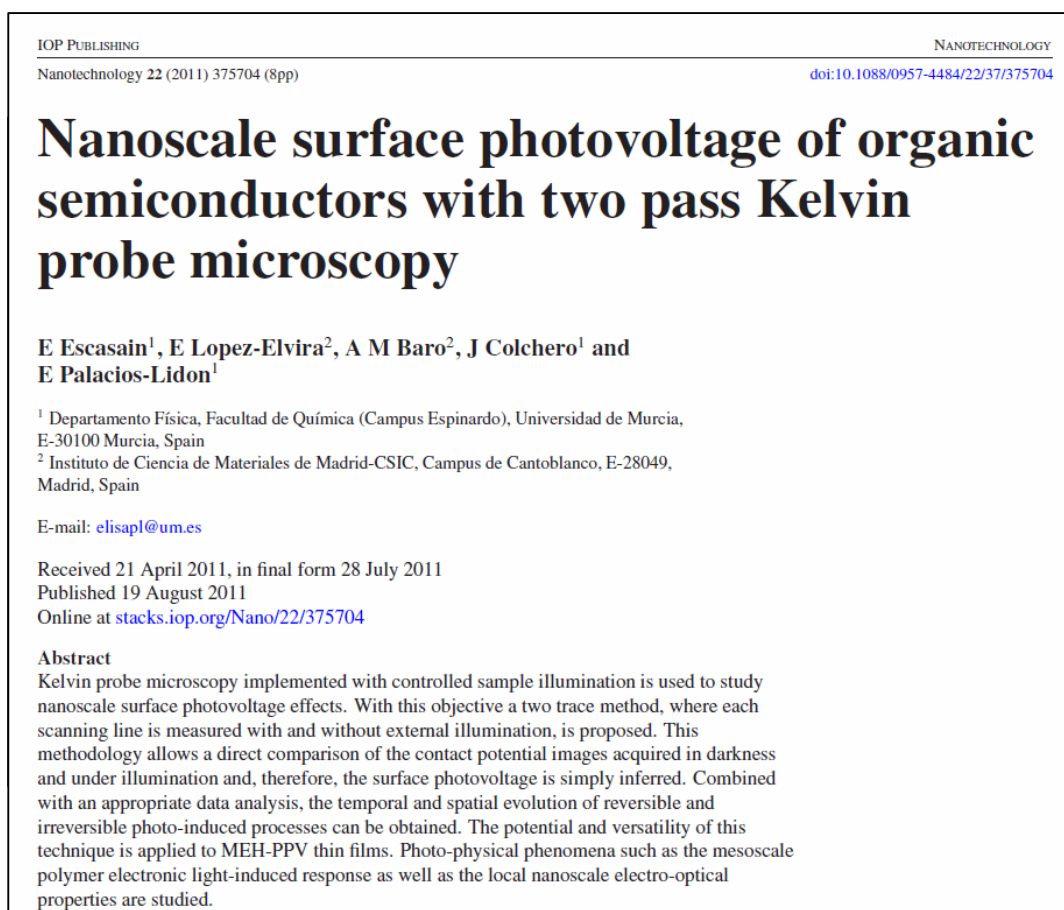


Figura 3.24. Publicación obtenida utilizando el SFM-1 y un novedoso método de medida al que se ha llamado "two pass method".

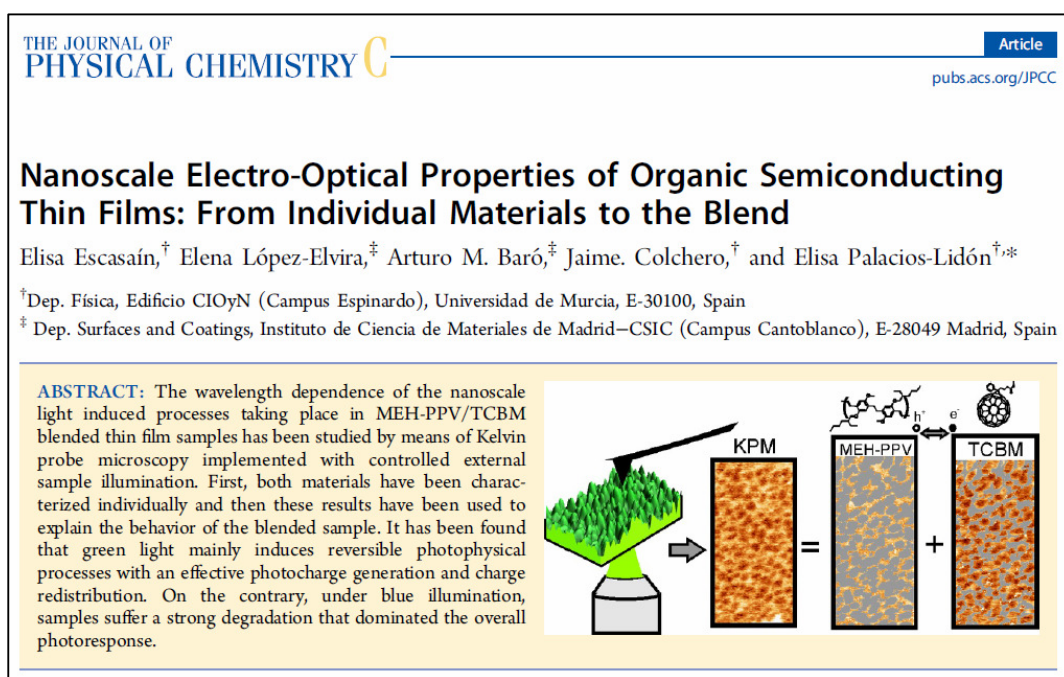


Figura 3.25. Publicación del estudio de propiedades electro-ópticas realizado con el SFM-1

Además, como ya se ha comentados anteriormente no solo es interesante estudiar los cambios inducidos a escala nanométrica mediante la iluminación controlada, sino poder correlacionar dichos cambios con las propiedades ópticas del sistema como se puede ver en la figura 3.26.

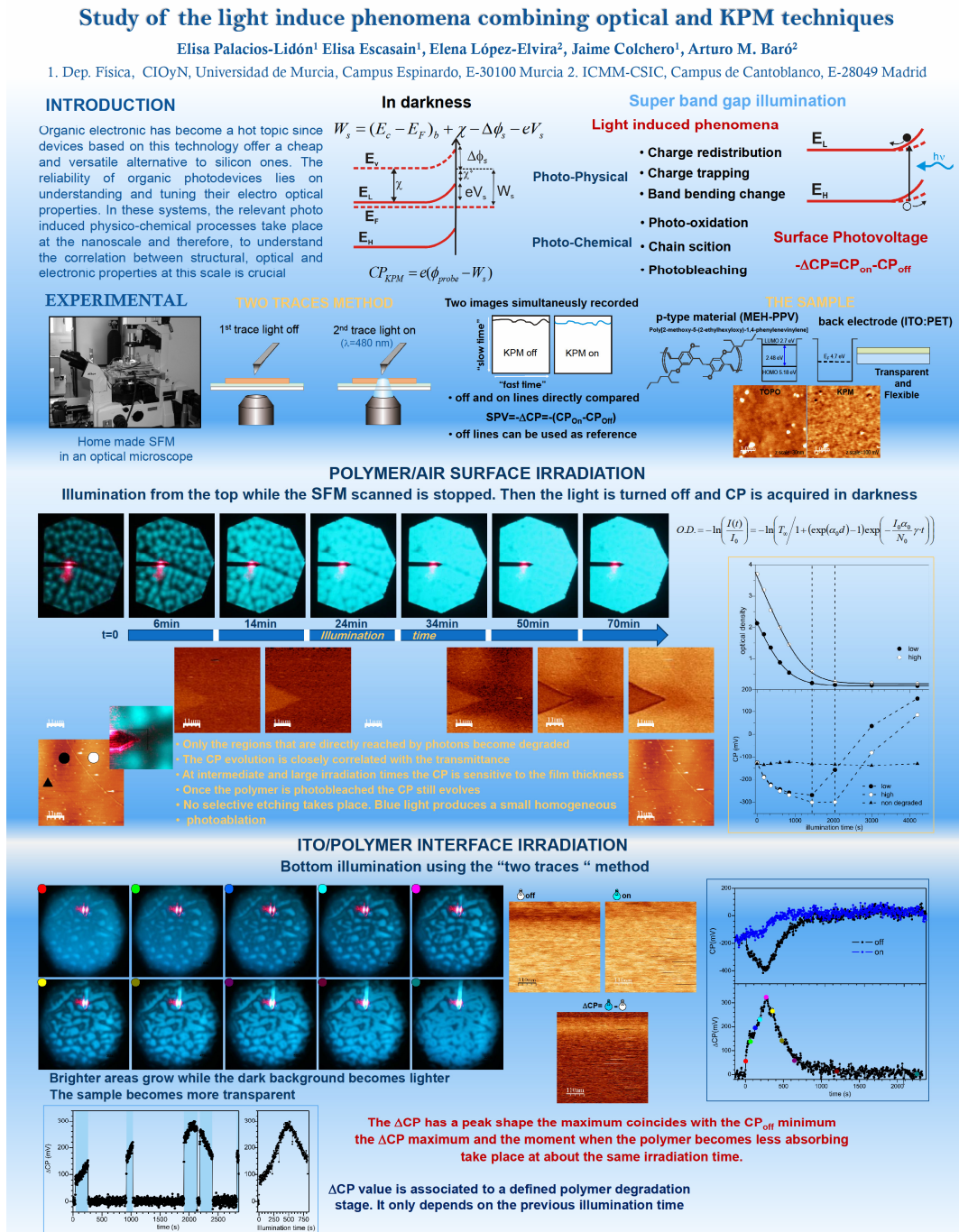


Figura 3.26. Estudio de los fenómenos inducidos por luz combinando KPM y microscopía óptica. Este trabajo presentado en un congreso con este póster se ha enviado a una revista para su publicación.

3.4 Referencias

- [BudgetSensors] www.budgetsensors.com
- [Colchero-Tesis] J. Colchero, Reibungskrafmikroskopie, Ph.D Thesis, Universität Konstanz, Germany, Hartung-Gorre Verlag, ISBN 3-89191-725- 2, 1993.
- [CoolLED] www.colled.com
- [Hamamatsu] www.hamamatsu.com
- [Nanotec] www.nanotec.es
- [Olympus] www.probe.olympus-global.com
- [Palacios-Lidón2009] Palacios-Lidón E, Pérez-García B, Colchero J. Enhancing dynamic scanning force microscopy in air: as close as possible. Nanotechnology 2009; 20(8): 085707.
- [Perez-Garcia2008] Perez-Garcia B, Abad J, Urbina A, Colchero J, Palacios-Lidon E. Surface potencial domains on lamellar P3OT structures. Nanotechnology 2008; 19(6):065709.
- [PI] www.physikinstrumente.com
- [Piezo Jena] www.piezosystem.com/
- [Schäfter-Kirchhoff] www.sukhamburg.com
- [Zeiss] www.zeiss.com

Capítulo 4. Mejoras en el diseño y desarrollo del SFM combinado con microscopía óptica

Una vez que se ha comprobado que el diseño del SFM-1 es adecuado y que funciona correctamente, se inicia el desarrollo de un segundo prototipo (SFM-2) de mayor complejidad que el anterior. Este segundo prototipo, incorpora una serie de mejoras respecto al primero con el fin de mejorar su funcionamiento, hacerlo más versátil y fácil de manejar. Algunas de estas mejoras ya estaban contempladas para éste segundo equipo, mientras que otras surgen de la experiencia en el manejo del SFM-1.

En la figura 4.1 se muestra una imagen del SFM-2. Si se compara con la fotografía del SFM-1 (figura 3.3) se pueden apreciar las diferencias de diseño de ambos microscopios. En este apartado primero se detallan las mejoras que incorpora este nuevo prototipo frente a su predecesor, a continuación se describe el diseño y desarrollo del SFM-2 y finalmente se muestran las medidas realizadas con el equipo.

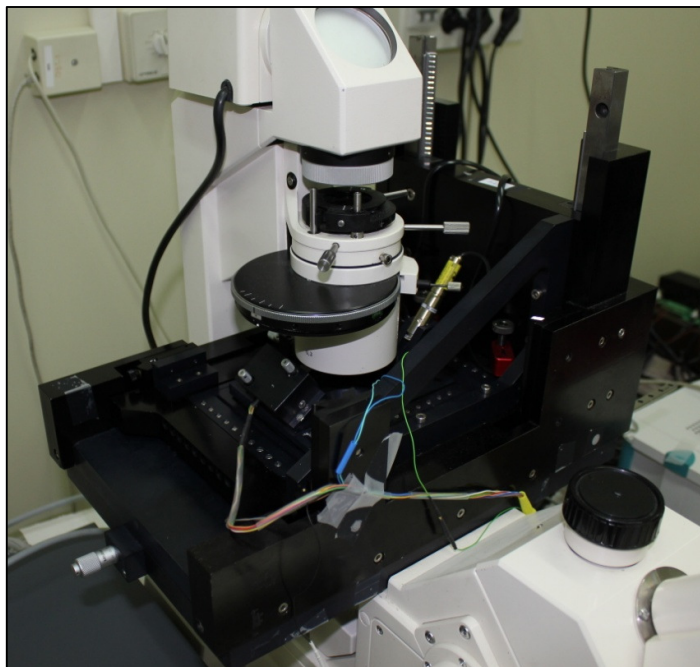


Figura 4.1. Fotografía del SFM-2 montado sobre el microscopio óptico Axiovert 100A de la marca Zeiss. Este SFM es más complejo en diseño que el anterior pero más cómodo y fácil de manejar.

4.1 Mejoras del SFM-2

Durante el manejo del SFM-1, ha sido posible comprobar que componentes y que partes del diseño podían ser optimizadas para mejorar su funcionalidad y por tanto se ha procedido a su modificación o sustitución.

Entre las mejoras incorporadas al SFM-2 cabe destacar las relativas al sistema de posicionamiento y barrido. Una característica general de los sistemas combinados SFM-MO es la necesidad de que el piezoeléctrico tenga un hueco que permita el paso de la luz. Esto conlleva un elevado tamaño y por tanto peso del piezoeléctrico, lo que deriva en bajas frecuencias de resonancia mecánicas y por tanto una respuesta lenta del sistema de realimentación, lo que proporciona una baja calidad de imagen. Esto limita especialmente el potencial de modos de medida como el *jumping* en el que el sistema actúa a frecuencias elevadas.

Para reducir los efectos de esta limitación se ha sustituido el piezoeléctrico cuadrado xy por dos piezoeléctricos en forma de L con un rango de barrido de $80\ \mu\text{m}$ que tienen menor tamaño y por tanto una mayor frecuencia de resonancia. Al montar estos dos piezoeléctricos, se obtiene un hueco interior mayor que permite medir en una placa Petri de $35\ \text{mm}$ de diámetro, que es de gran utilidad para estudiar cultivos biológicos en condiciones fisiológicas. Además para facilitar las medidas de muestras biológicas de gran tamaño, como pueden ser las células, se ha montado otro sistema piezoeléctrico con un elevado rango de barrido, $200\ \mu\text{m}$ en xy y $20\ \mu\text{m}$ en z .

Sin embargo la gran mejora frente a los inconvenientes derivados de los piezoeléctricos masivos, proviene de la incorporación de un sistema piezoeléctrico z de $2\ \mu\text{m}$ de barrido en un caso y $6\ \mu\text{m}$ en otro, que actúa sobre la punta del SFM. Estos piezoeléctricos de baja masa y elevada frecuencia de resonancia, aportan mayor velocidad y resolución fundamentalmente por el hecho de estar desacoplados del sistema piezoeléctrico xy de baja frecuencia de resonancia que actúa sobre la muestra. Esto mejora la respuesta dinámica permitiendo realizar medidas en modo *jumping* a gran velocidad, como veremos más adelante. La solución óptima a la hora de adquirir imágenes viene dada por la combinación de ambos sistemas de barrido en z , por un lado el sistema más masivo y lento que actúa sobre la muestra con un rango de barrido mayor y por otro lado el sistema rápido y ligero con menor rango de barrido. En el apartado 4.3 veremos lo relativo a este sistema piezoeléctrico, que llamaremos

Z-punta y a las posibilidades de combinación que permiten sacar el máximo partido a las ventajas de cada uno de ellos, en función de la muestra que se vaya a medir.

En la tabla 4.1 se muestran las principales características de los piezoeléctricos empleados tanto en el SFM-1 como en el SFM-2, con el fin de poder realizar una comparativa entre ellos.

En el SFM-2 se han utilizado piezoeléctricos de la marca Piezo System Jena [PiezoJena]. Se montó en primer lugar el modelo PXY 80 D12, que realiza un barrido en xy de 80 μm , combinado con el modelo N8/S3.5 de 8 μm de desplazamiento en z. En un diseño posterior que permite un mayor barrido de la muestra, se han empleado para el movimiento xy el modelo PXY 200 D 12 de Piezo System Jena, con un rango de 200 μm , mientras que para el movimiento en z, se han utilizado 3 piezoeléctricos modelo 45-1143 de la marca APC con 20 μm de rango en unipolar y 28 en semi-bipolar [APC]. En unipolar la tensión que se aplica al piezoeléctrico va de 0 a 150 V, mientras que en el rango semi-bipolar va de -30 a 150 V. Para el sistema de barrido en el eje z situado en el portapuntas, se han utilizado los siguientes piezoeléctricos de Piezo System Jena. El modelo N2/5 para el conjunto que permite barrer 2 μm y el modelo N6/5 para el conjunto con 6 μm de rango.

Modelo	Tamaño (mm)	Despl. xy (μm)	Despl. z (μm)	F.reson. (KHz)	C (μF)	Resol. (nm)	m_{eff} (g)	k [N/ μm]
P733.3DD	100x100x25 Int. 50x50	30/30	10	1,2 1,1(z)	6,2/6,2/3,3	0,1	675	4 10(z)
P733.2CD	100x100x25 Int. 50x50	100/100	-	500	6	0,2	580	1,5
P 810.10	$\varnothing 6 \times 20$	-	15	22	0.3	0,15	4	14
PXY 80 D12	55x53,5x16 Int. 62x60	80/80	-	0,9(x) 1,2(y)	1,7	0,16	90	0,8/0,55
N8/S3.5	9 x 7,5 x 5.5	-	8		0,4	0,018		46
PXY 200 D12	57,5x64x16 Int. 62x60	200/200	-	0,4(x) 0,6(y)	2,6	0,4	160	0,3/0,2
45-1143	3.5x3.5x18	-	20-28	50	0.8			25
N2/5	$\varnothing 5 \times 5$	-	2		0,1	0,004		250
N6/5	$\varnothing 5 \times 9$	-	6		0,3	0,012		83

Tabla 4.1. Cuadro con las principales características de los distintos piezoeléctricos empleados en los diseños realizados. Las tres primeras filas corresponden a piezoeléctricos utilizados en el SFM-1 mientras que los demás se han utilizado en el SFM-2. Hay casillas que aparecen en blanco porque el fabricante no facilita esa información, mientras que si aparece un guión es porque ese parámetro no existe para ese piezoeléctrico.

Como vimos en el apartado 3.2.1 del capítulo anterior, en el SFM-1 se esperaba realizar el movimiento grueso de la muestra con respecto a la punta (para seleccionar la zona de medida) de forma inercial por medio del sistema piezoeléctrico xy. No ha sido posible desplazar la muestra de esta forma por no tener el piezoeléctrico una respuesta lo suficientemente rápida, por lo tanto el SFM-2 incorpora una *mesa XY* que realiza este desplazamiento de forma motorizada con un rango de ± 3 mm, aunque también se puede mover manualmente. Además en el SFM-2 la muestra se coloca desde la parte de abajo del SFM, sin tener que mover ningún otro componente del microscopio, a diferencia del SFM-1 en el que la muestra se coloca desde arriba y para cambiarla es necesario mover el *portapuntas*. Por tanto ahora cambiar la muestra resulta más seguro, rápido y cómodo.

En el SFM-1 la aproximación entre la punta y la muestra se realiza desplazando la *mesa Z* por medio de tres tornillos micrométricos (figura 3.7) a través de cuatro varillas que permanecen fijas en la *mesa XY* tal como se muestra en la figura 3.5. Este desplazamiento no está lo suficientemente guiado y al bajar más de un micrómetro que de los demás la *mesa Z* no baja perfectamente horizontal, sino que se inclina hacia la dirección de ese tornillo micrométrico. Esto produce un pandeo en la *mesa Z* que incluso puede llegar a frenar el acercamiento si no se baja, dentro de lo posible, por igual con los tres micrómetros. Para evitar este movimiento no homogéneo del desplazamiento en z, el SFM-2 incorpora un sistema de guías (modelo N/O y M/V con jaula de agujas [Schneeberger]) que hace que la aproximación punta-muestra sea mucho más estable y definida. Además esta aproximación está motorizada en el SFM-2 y el sistema de guías verticales permite bajar de manera horizontal con un único motor (figura 4.9). Por el hecho de estar motorizado el acercamiento punta-muestra en el SFM-2 es más cómodo y preciso que en el SFM-1.

Se ha incorporado un microscopio óptico en la parte superior del SFM-2, para poder observar en reflexión muestras que no son transparentes (esto es, iluminar y observar desde arriba) o para iluminar muestras transparentes en transmisión por medio de un objetivo de 10x y larga distancia de trabajo (33,5 mm), en lugar de utilizar el condensador, que tiene mayor diámetro y menor distancia de trabajo (25 mm) (figura 4.2). Esto nos ha facilitado medir muestras opacas con gran porosidad al poder ver la colocación de la micropalanca sobre la zona donde se desea medir y evitar así situarse sobre los poros (figura 4.3).



Figura 4.2. Imagen del microscopio óptico montado sobre el SFM para poder observar muestras opacas en reflexión o para iluminar en transmisión a través del objetivo. En la imagen de la izquierda se puede ver el sistema completo que va desde el objetivo hasta la cámara que detecta la imagen. A la derecha se muestra un detalle en el que se aprecia como se sitúa el objetivo sobre el SFM a la distancia de trabajo adecuada para focalizar la micropalanca. Se puede observar que a esa distancia tan próxima no se puede colocar el condensador del microscopio por tener un mayor diámetro que el objetivo.

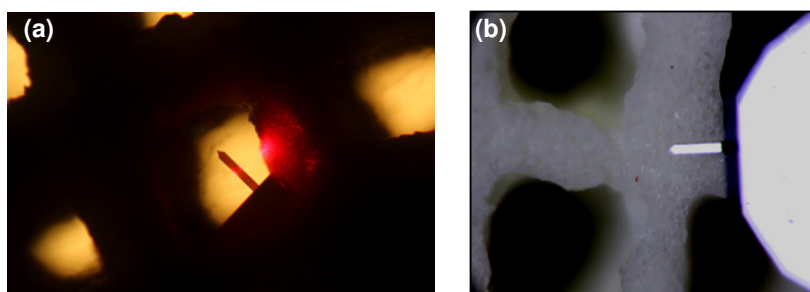


Figura 4.3. Imágenes ópticas obtenidas de una muestra opaca con poros de 400 nm. (a) con el microscopio óptico invertido solo podemos ver la micropalanca cuando esta se sitúa sobre uno de los poros. (b) con el microscopio situado sobre el SFM podemos ver la muestra y posicionar fácilmente la micropalanca en la zona que se desea medir.

Otro inconveniente que encontramos en el SFM-1, es que el láser del sistema de detección que tiene una longitud de onda de 635 nm puede interferir en los experimentos cuando se trabaja con muestras que bien absorben o emiten en el rojo. Por ejemplo, no es posible realizar medidas simultáneas de SFM con fluorescencia en el rojo ya que la longitud de onda del láser se encuentra dentro de la banda de emisión de los fluoróforos que emiten en rojo y por tanto el láser no queda filtrado y llega al sistema de detección haciendo imperceptible la señal procedente de los fluoróforos, que es de mucha menor intensidad. Para poder realizar este tipo de experimentos de

manera simultánea, se ha sustituido el láser con longitud de onda de 635 nm del sistema de detección por uno de 685 nm [Schäfter + Kirchhoff]. Además este nuevo láser está guiado por fibra óptica lo que le hace más estable y permite alcanzar mayor resolución.

Otra mejora incorporada al SFM-2 es un sistema de temperatura variable (figura 4.4) por medio de un módulo Peltier con un orificio central que permite tanto calentar como enfriar la muestra con una capacidad de refrigeración máxima de 14,7 W y una diferencia de temperatura máxima de 74°C [Global Component Sourcing]. La principal finalidad de incluir este sistema es la realización de experimentos biológicos en los que es fundamental mantener la muestra a su temperatura funcional, como ocurre con las medidas de células “in vivo”, en las que es necesario mantener la temperatura entre 36 y 39 °C. Sin embargo este sistema permite realizar cualquier experimento que requiera una variación de temperatura dentro de su rango de funcionamiento, como el que se presenta en el apartado 4.3 llevado a cabo con polímeros.

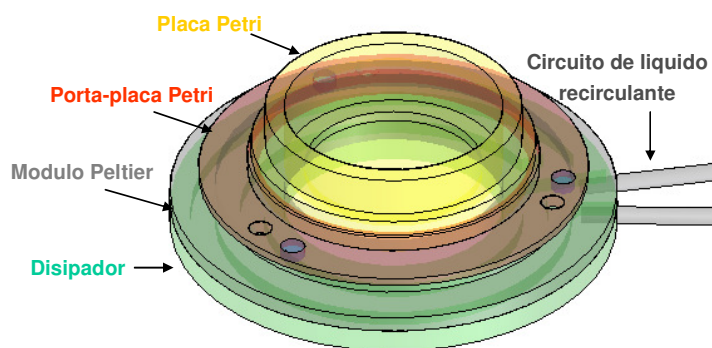


Figura 4.4. Diseño del conjunto portamuestras con temperatura variable por medio de un módulo Peltier con un orificio central para medir en una placa Petri. Bajo el módulo Peltier se coloca un disipador de temperatura por medio de un circuito de líquido refrigerante.

Resumiendo, las mejoras que se han incorporado en el SFM-2 frente a su predecesor son:

- Piezoeléctrico xy más ligero y por tanto con menor frecuencia de resonancia.
- Mayor hueco interior en el piezoeléctrico xy lo que permite medir en el interior en una placa Petri.

- Sistema de barrido z desacoplado del xy que actúa sobre la punta del SFM lo que permite mayor velocidad de barrido.
- Mesa xy que permite el desplazamiento motorizado de la muestra respecto a la punta para cambiar de zona.
- La muestra se coloca desde debajo del SFM sin tener que mover otros componentes.
- Sistema de guías en z más robusto y estable.
- Acercamiento punta-muestra motorizado.
- Microscopio óptico para medidas en reflexión.
- Láser del sistema de detección de 685 nm que permite realizar medidas simultáneas de fluorescencia en el rojo.
- Sistema de temperatura variable con una variación máxima de temperatura de 74°C.

4.2 Diseño del SFM-2

Al igual que en el caso anterior a continuación se muestran los componentes del SFM divididos ahora en cuatro grandes bloques, que son la **mesa XY- eje óptico** que como en el primer prototipo centra la punta en el eje óptico, la **mesa XY-muestra** que permite desplazar la muestra respecto a la punta para poder elegir la zona a medir, la **mesa Z** que acerca la punta a la muestra para poder realizar las medidas y el **sistema de detección** que incluye el láser y el fotodiodo. Dentro de la mesa Z hay un diseño que incluye un sistema piezoeléctrico en z que actúa sobre la punta del SFM. Este sistema **z-punta**, como ya se ha mencionado se verá de forma detallada en el apartado 4.4 junto con las medidas realizadas con él.

En la figura 4.5 se muestra un corte transversal del SFM-2 sobre el microscopio óptico invertido, en el que se pueden ver los principales componentes que lo forman, así como el camino óptico del láser en el sistema de detección.

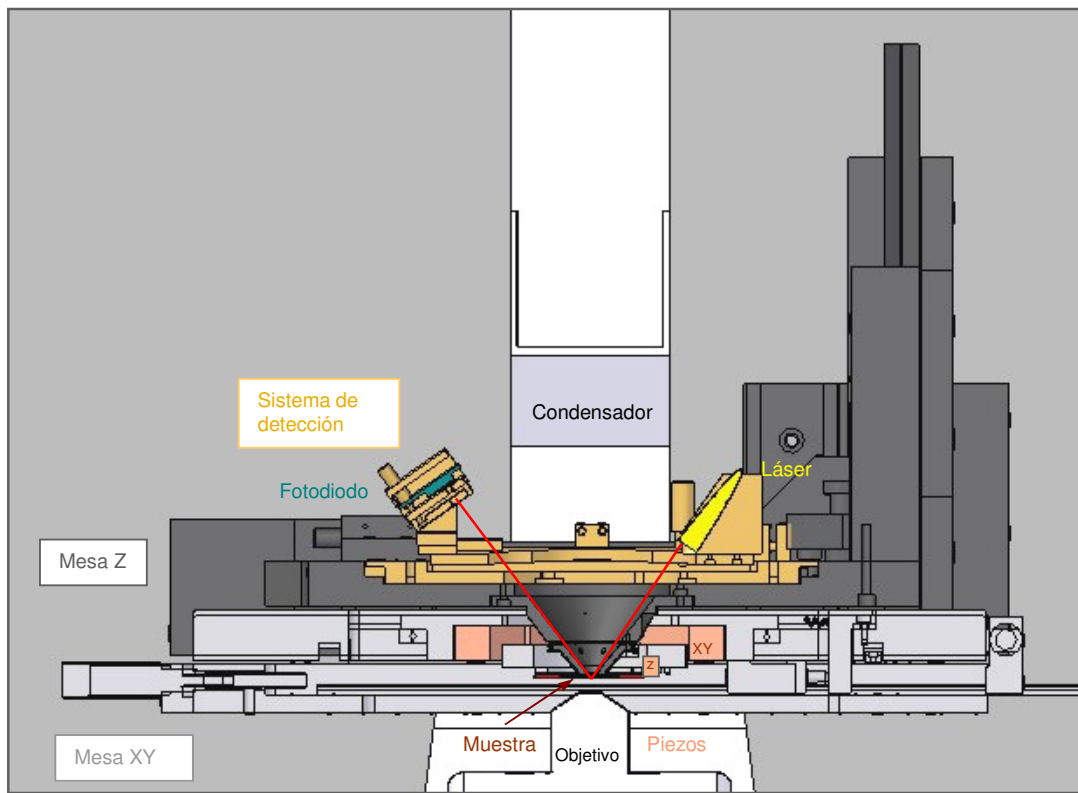


Figura 4.5. Corte transversal del SFM-2 sobre el microscopio óptico invertido, en el que se pueden apreciar sus principales componentes. La línea roja muestra el camino óptico del láser del sistema de detección.

4.2.1 Mesa XY

Está compuesta por dos mesas XY. La **mesa XY- eje óptico**, que es la encargada de centrar la punta en el eje óptico del microscopio invertido (al igual que en el SFM-1) y la **mesa XY-muestra** que permite desplazar por medio de motores la muestra respecto a la punta para situarnos en la zona deseada. Ésta última incorpora el sistema piezoeléctrico tanto en xy como en z. En la figura 4.6, se puede ver la mesa XY completa y en las figuras 4.7 y 4.8, aparecen las mesas que la forman, respectivamente (mesa XY- eje óptico y la mesa XY- muestra).

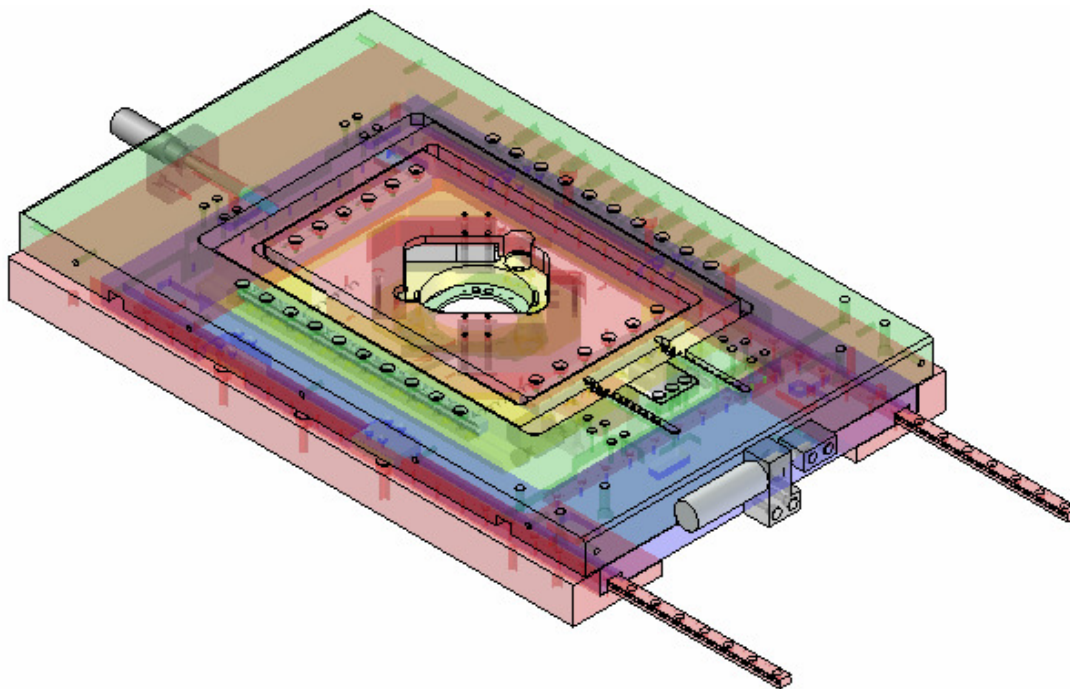


Figura 4.6. Mesa XY completa formada por la mesaXY que centra la punta en el eje óptico y la que permite mover con motores la muestra respecto a la punta y que alberga el sistema piezoeléctrico que actúa sobre la muestra.

A) Mesa XY- eje óptico

La mesa XY-eje óptico, es la encargada de centrar la punta en el eje óptico del microscopio invertido al igual que en el SFM-1. El desplazamiento se realiza por medio de tornillos micrométricos (modelo 148-804) [Mitutoyo]. En la figura 4.7 pueden verse los componentes que la forman (piezas, guías, tornillos micrométricos, imanes...)

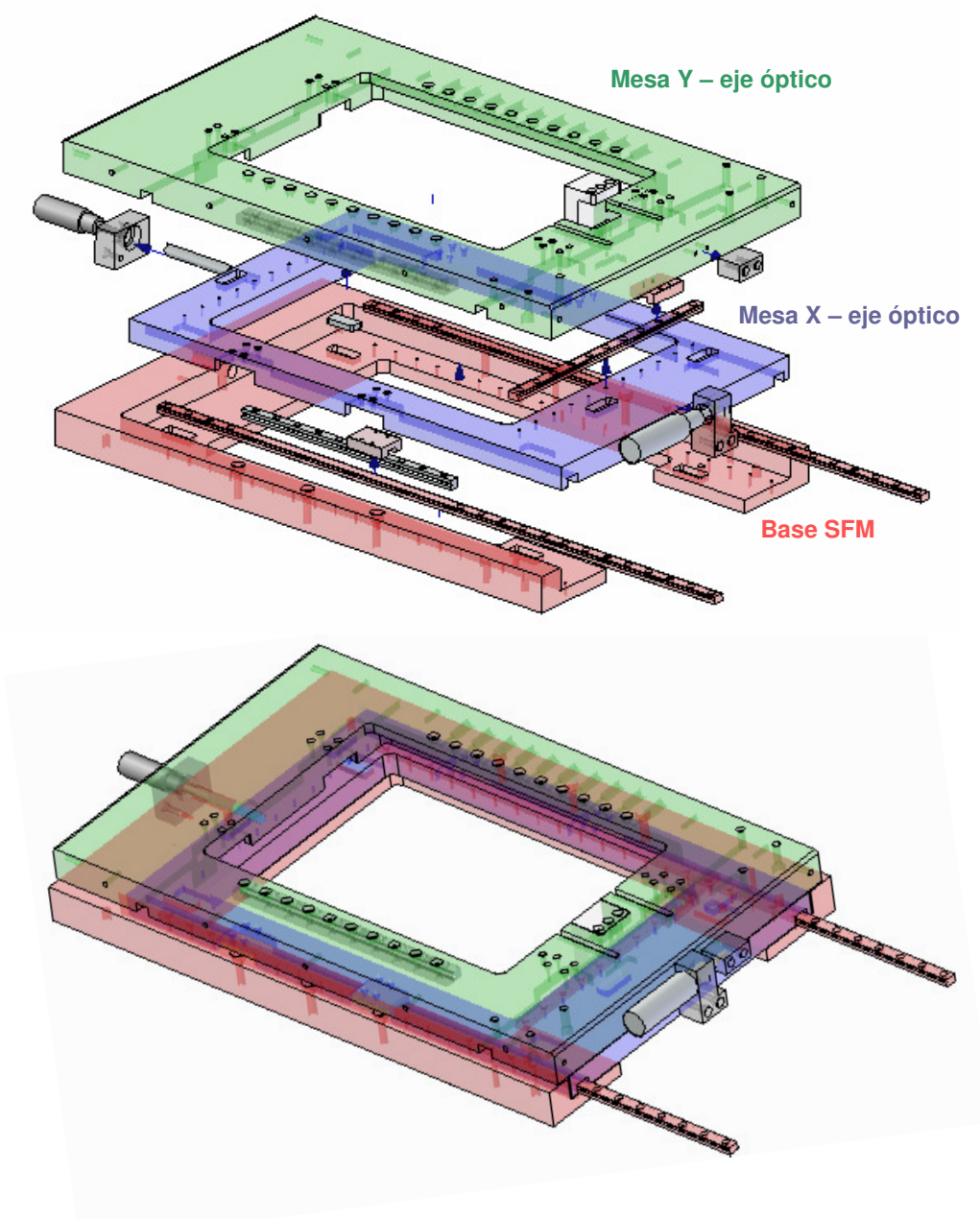


Figura 4.7. En la imagen inferior se puede ver la Mesa XY- eje óptico montada mientras que en la superior se aprecia el desglose de los componentes que la forman.

B) Mesa XY- muestra

La **mesa XY-muestra** permite mover la muestra por medio de motores en un rango de ± 3 mm respecto de su posición centrada por medio de un sistema de guías (modelo R2) [Schneeberger]. En la figura 4.8 se pueden ver los componentes que la forma. En el interior de esta mesa de desplazamiento se encuentra el sistema piezoeléctrico que realiza el barrido de la muestra. Éste está formado por los dos **piezoeléctricos XY**, por la pieza que incorpora los 3 piezoeléctricos en el eje z (**porta-**

piezosZ) y la base a la que se fija por medio de imanes el portamuestras (**base porta-piezos**).

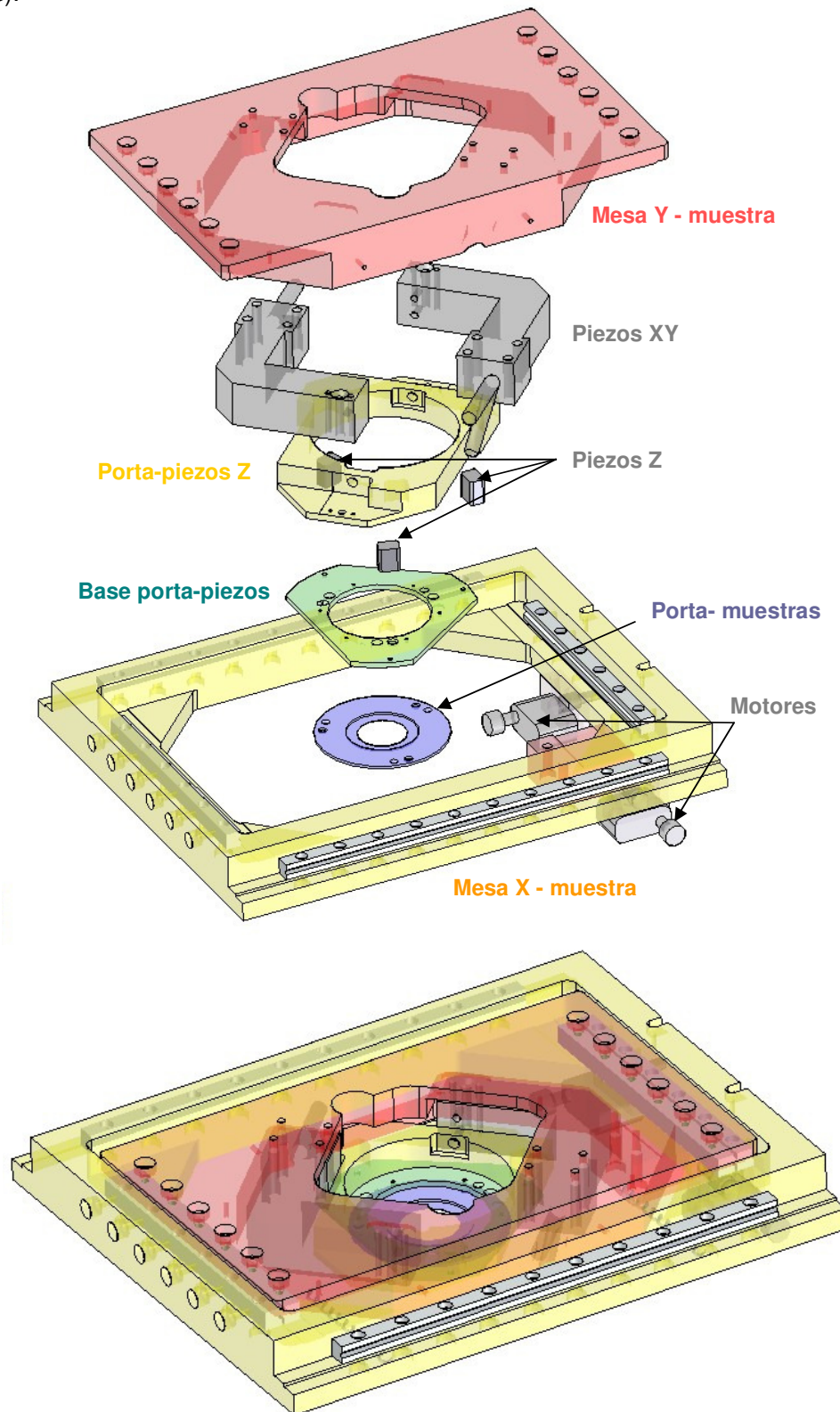
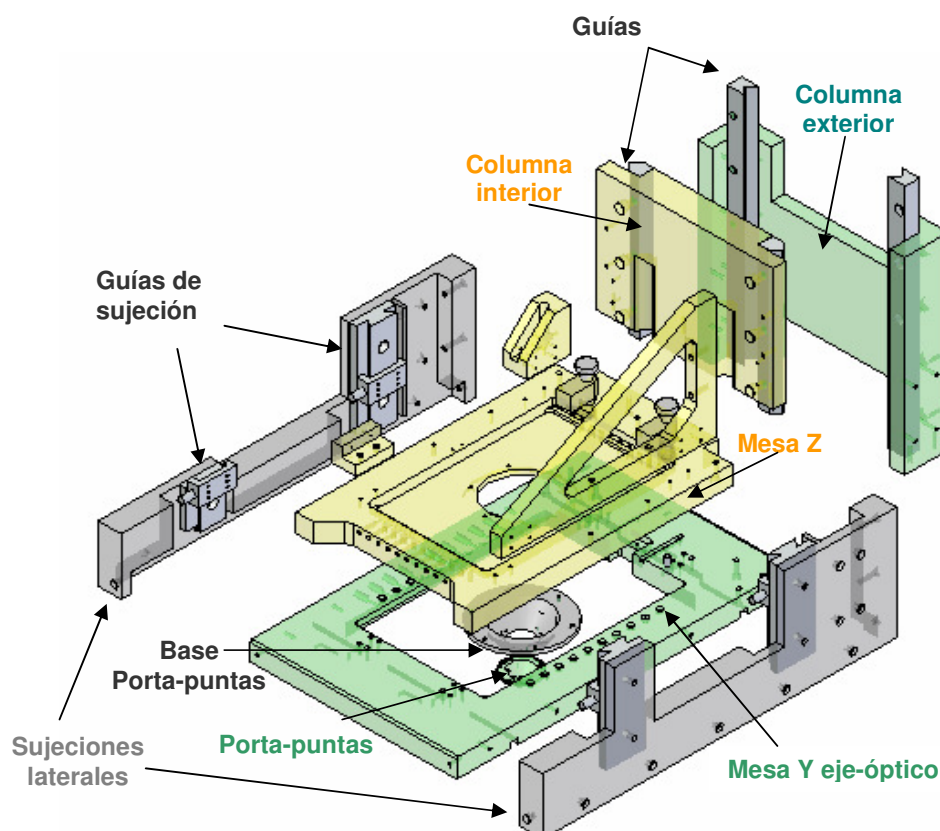


Figura 4.8. En la imagen inferior aparece la **Mesa XY- muestra** ensamblada mientras que en la imagen superior aparecen los componentes que la forman.

4.2.2 Mesa Z

La mesa Z como en el SFM-1 tiene como finalidad acercar la punta a la muestra para realizar las medidas de SFM. En este caso el microscopio lleva un sistema de guías vertical (modelo N/O y M/V con agujas de Schneeburger) que mantiene la horizontalidad de la **mesa Z** respecto a la **mesa XY** durante la aproximación motorizada en el eje z (figura 4.9). Además incorpora otro sistema de guías (**guías de sujeción**) que permite fijar la posición de la mesa Z una vez que se encuentra en rango para realizar las medidas de SFM. De esta manera se puede desacoplar el apoyo del motor haciendo que sea más estable la posición de ambas mesas y por tanto la distancia punta-muestra. La **base porta-puntas** se atornilla a la **mesa Z** desde la parte superior para poder sustituirla de manera fácil y rápida por otra **base porta-puntas** que disponga de un sistema piezoeléctrico que actúa sobre la micropalanca (apartado 4.3). A su vez el **porta-puntas** se fija a la **base porta-puntas** por medio de imanes con un sistema de auto-centrado por bolas. La sujeción por imanes facilita enormemente la extracción y colocación del porta-puntas para sustituir la micropalanca.



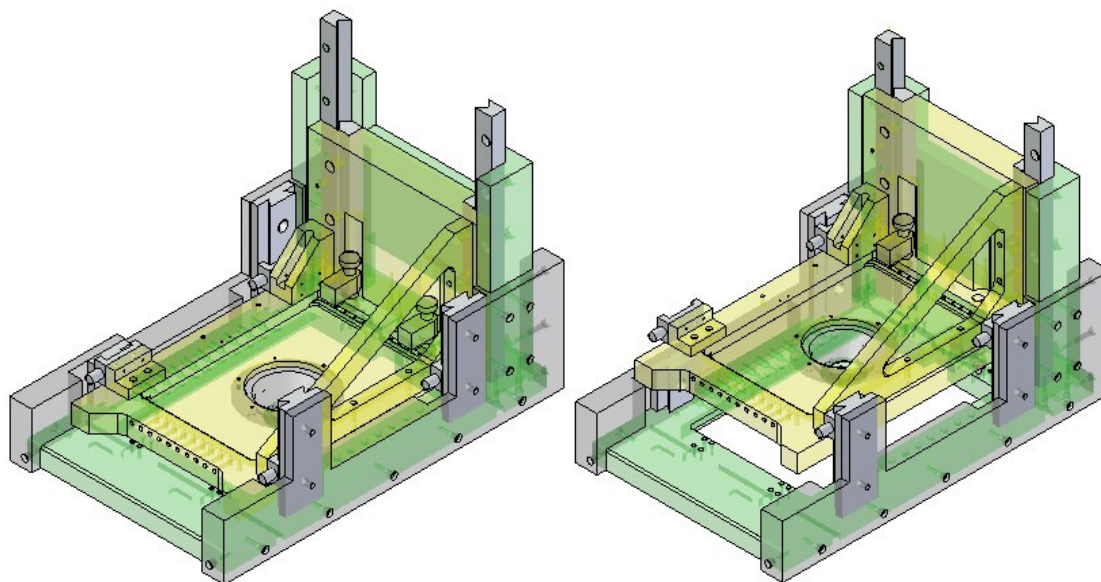


Figura 4.9. En la parte superior de la imagen (página anterior) se pueden ver los componentes que forman la **mesa Z**. En la parte inferior se muestran dos imágenes del sistema montado. En la parte izquierda la **mesa Z** se encuentra en una posición cercana a la muestra y por tanto en rango de realizar medidas, mientras que en la parte derecha se puede ver una posición elevada de la **mesa Z** que permite sustituir la **base porta-puntas**, así como colocar o extraer el **porta-puntas** para cambiar la micropalanca.

4.2.3 Sistema de detección

Al igual que en el SFM-1 la detección de la interacción entre punta y muestra se lleva a cabo por medio de un sistema de deflexión del haz láser que incide sobre la micropalanca y que llega a un fotodiodo de cuatro cuadrantes. En la figura 4.10 se muestra el diseño del sistema de detección que se ha incorporado en el SFM-2. En este caso el haz láser incide sobre la micropalanca directamente y no a través de un espejo como en el SFM-1. Para ello el láser se ha posicionado con el ángulo adecuado para que quede lo más alejado del eje óptico del MO, pero que esté dentro del cono de la AN de las piezas de manera que pueda llegar a la micropalanca. Además para posicionar el haz láser sobre el fleje se ha utilizado una mesa XY (**mesa XY –láser**) montada sobre guías (modelo R1 de Schneeberger) y desplazada por medio de tornillos micrométricos (modelo 148-207) [Mitutoyo]. Posteriormente la **mesa XY del fotodiodo** permite realizar el ajuste grueso de la posición del haz láser sobre el centro del fotodiodo, mientras que el ajuste fino se realiza por medio de unos tornillos

micrométricos (modelo 148-216 de Mitutoyo) que acaban de centrar la posición del láser al actuar sobre una ventana de vidrio que desvía el haz al cambiar de inclinación.

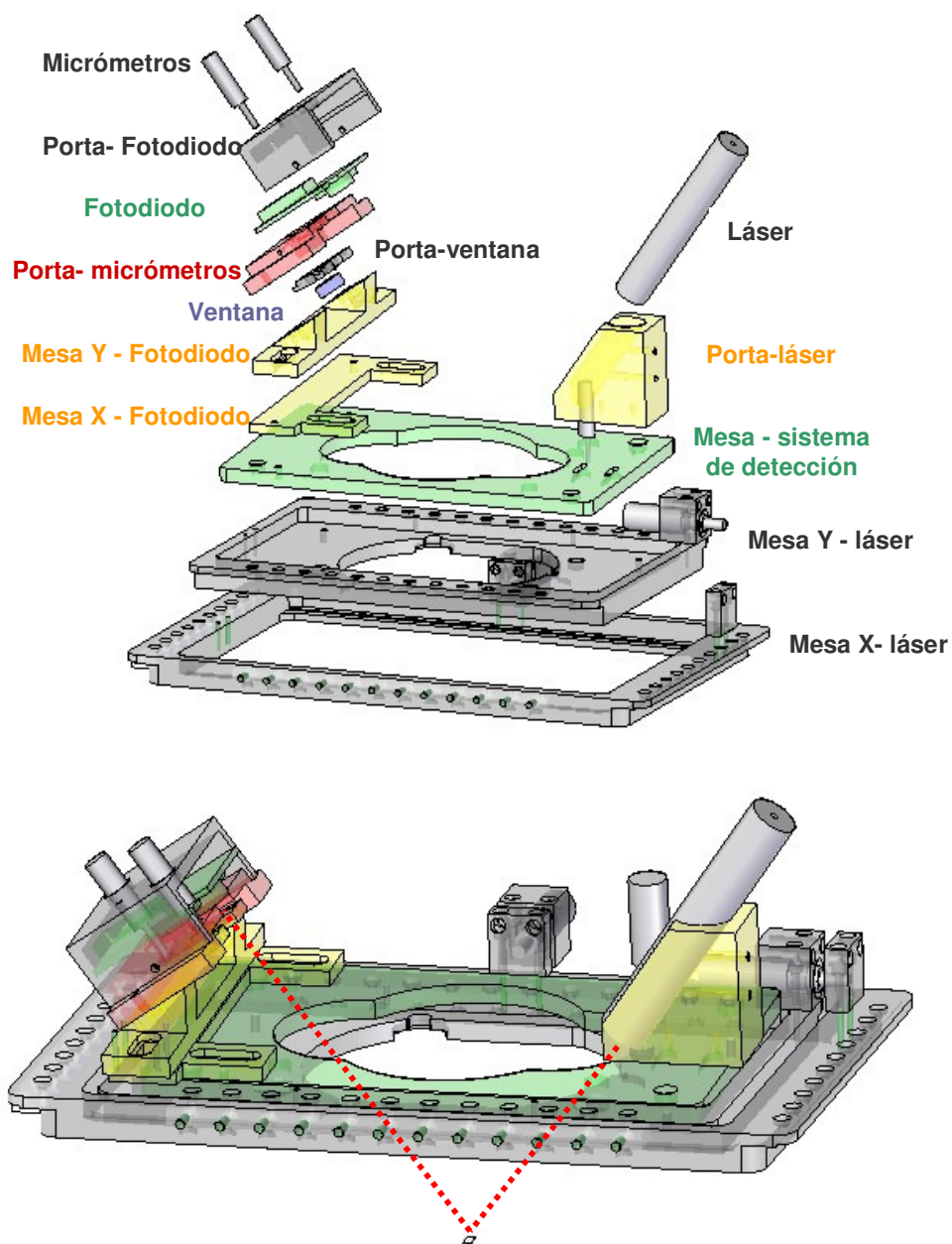


Figura 4.10. En la parte superior de la imagen se pueden apreciar los componentes que forman el sistema de detección y en la parte inferior el sistema de detección montado y el camino que sigue el láser hacia la micropalanca y posteriormente al fotodiodo.

El sistema de detección está montado sobre la **mesa del sistema de detección** que se fija a la **mesa Y del láser** por medio de imanes para facilitar la extracción del sistema de detección completo, en caso de que fuera necesario para realizar medidas con el MO que interfieran con la colocación de éste. Además la **mesa del sistema de detección** incorpora un tornillo micrométrico que permite variar el ángulo de todo el sistema de detección respecto a la micropalanca. Esto permite colocar el sistema de detección con la misma inclinación de cuatro grados que tiene el fleje, de forma que el haz se mantiene perpendicular al plano del sistema de detección. También se pueden compensar las variaciones que pudiera haber en el ángulo de cuatro grados con que se pega el fleje al **porta-puntas** cada vez que se cambia. Esta inclinación de cuatro grados viene dada por la geometría del sistema. El fleje debe tener una inclinación mínima que asegure poder medir adecuadamente sin que ninguna parte del “chip” al que va sujeto el fleje o el propio **porta-puntas** toque antes la muestra, impidiendo que la micropalanca interaccione con la misma. Según aumenta el ángulo de inclinación de la micropalanca aumenta la desviación del haz reflejado. Por otro lado este ángulo de inclinación (α) no puede ser muy elevado porque eso haría que el haz reflejado tuviera un ángulo tan grande (2α) que no superara la apertura numérica definida por las piezas del SFM. Para ángulos elevados el reflejo del haz sobre el fleje esta tan alejado que el fotodiodo tendría que situarse fuera de las piezas del SFM o el sistema de detección tendría que estar demasiado inclinado.

Del mismo modo que en el SFM-1 se ha utilizado un fotodiodo modelo S4349 [Hamamatsu] y un diodo láser de 635 nm con distancia focal del 70mm y un diámetro de haz en el foco de unas 30 μm [Schäfter-Kirchhoff] que posteriormente se ha sustituido por un diodo láser con las mismas características, pero con una longitud de onda de 685 nm y guiado por fibra óptica como se ha visto en el apartado 4.1

Por último sólo falta ensamblar todas las partes anteriormente descritas para obtener el diseño completo del SFM-2 (figura 4.11)

Las piezas del segundo prototipo se han fabricado en el taller mecánico del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Una vez que el taller finaliza y nos entrega las piezas procedemos al montaje del equipo y a probar la funcionalidad del mismo.

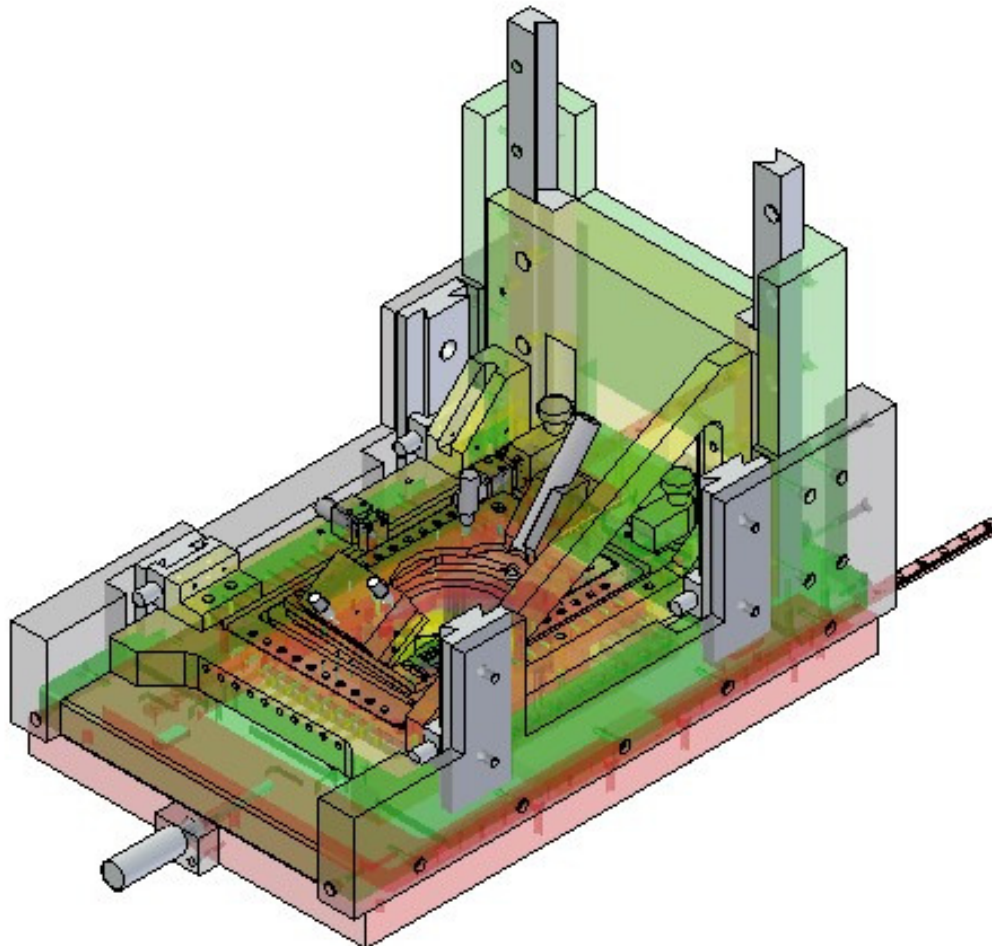


Figura 4.11. Diseño completo del SFM-2

4.3. Resultados

Igual que en el SFM-1, el primer paso para obtener resultados consistió en calibrar los sistemas piezoeléctricos empleados para lo que se utilizaron patrones de topografía conocida (figura 4.12). Una vez calibrado el sistema piezoeléctrico, se confirmó que el sistema de barrido funcionaba correctamente en todos los rangos deseados. Para ello se midieron muestras tanto de baja rugosidad como el DNA (figura 4.13), como muestras de gran rugosidad como los fibroblastos (figuras 4.14 y 4.15). Por último, se muestran unas medidas combinadas de SFM y fluorescencia de esferas de poliestireno de 300 nm de diámetro marcadas con Dil (1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato) que demuestran la viabilidad de realizar medidas de SFM combinadas con medidas ópticas.

- **Imágenes de calibración**

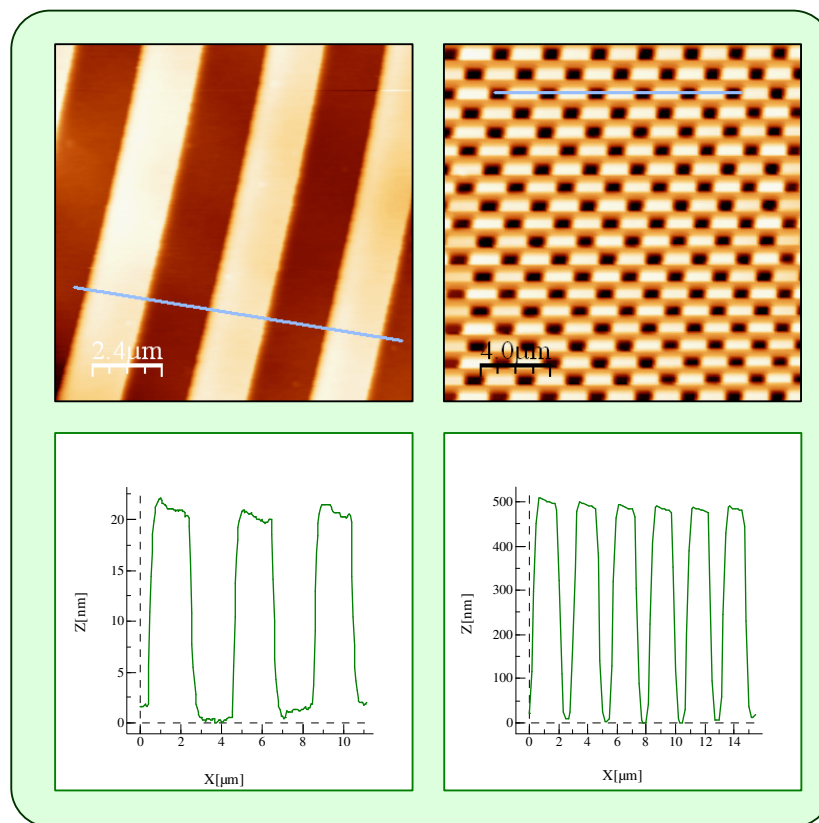


Figura 4.12. Imágenes de patrones de calibración. A la izquierda una imagen de $12 \times 12 \mu\text{m}^2$ de un patrón de calibración de $3 \mu\text{m}$ de periodo y $17,9 \text{ nm}$ de altura adquirida en modo contacto. A la derecha una imagen de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ de una rejilla cuadrada de $3 \mu\text{m}$ de periodo y 900 nm de altura adquirida en modo contacto. En la parte inferior se muestra el perfil correspondiente a la línea azul de cada imagen.

- **DNA**

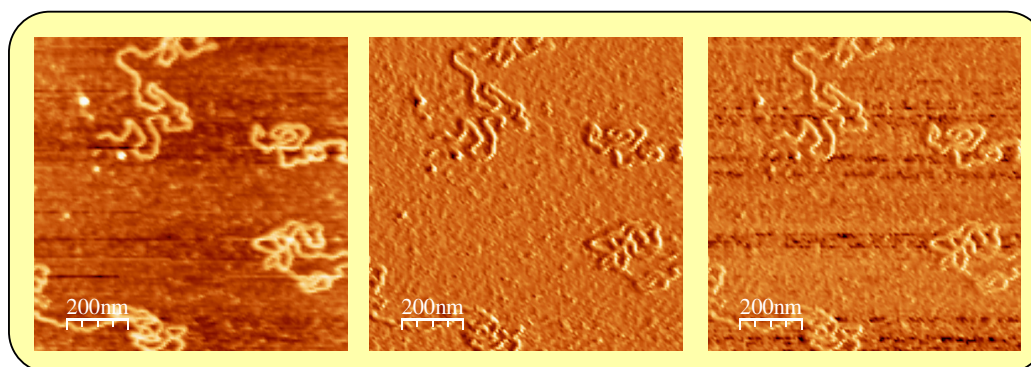


Figura 4.13. Imagen de topografía de DNA (izquierda), amplitud (centro) y frecuencia (derecha) medidas en aire en modo dinámico AM-DSFM.

- **Fibroblastos**

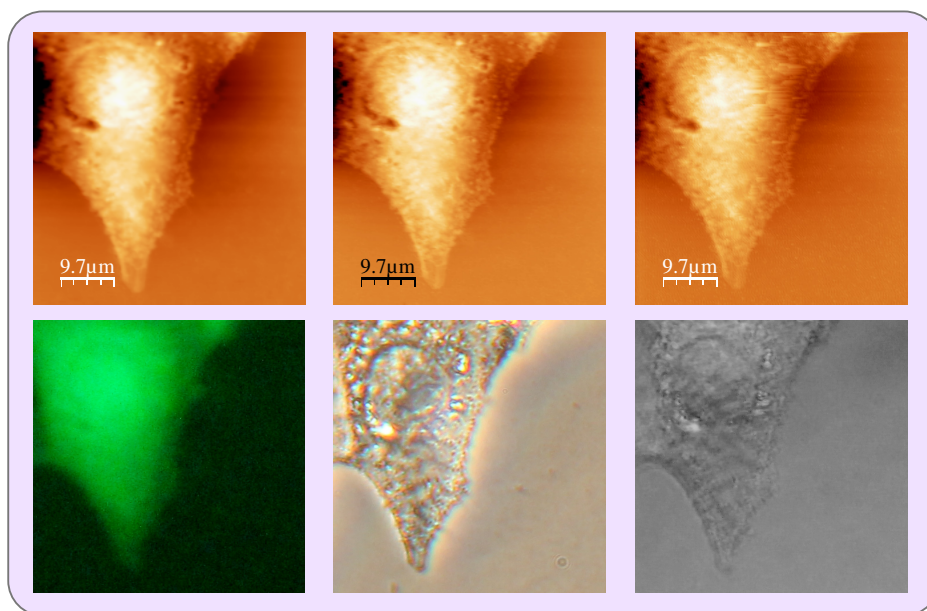


Figura 4.14. En la línea superior imágenes de fibroblastos medidos en (a) modo AM-DSFM, (b) modo contacto y (c) modo jumping. La escala en z es de 720 nm. En la línea inferior imágenes ópticas de las misma zona de la muestra medidas con distintas técnicas ópticas. (d) imagen de fluorescencia del mismo fibroblasto medido con SFM marcado con GFP (e) imagen en contraste de fases y (f) imagen en DIC.

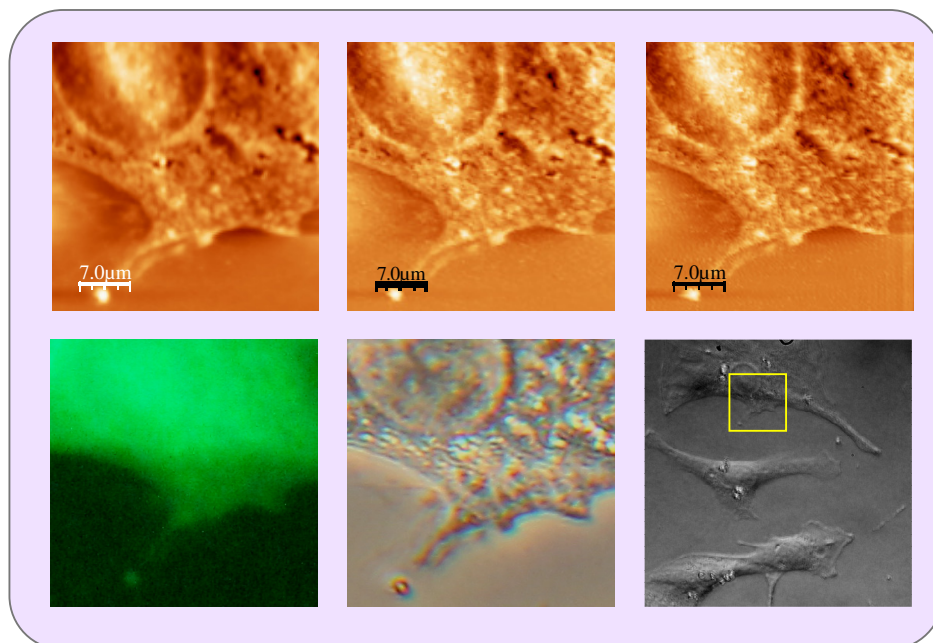


Figura 4.15 En la línea superior imágenes de fibroblastos medidos en (a) modo AM-DSFM, (b) modo contacto y (c) modo jumping. La escala en z es de 360 nm. En la línea inferior imágenes ópticas de las misma zona de la muestra medidas con distintas técnicas ópticas. (d) imagen de fluorescencia del mismo fibroblasto medido con el SFM marcados con GFP, (e) imagen en contraste de fases y (f) imagen en DIC. El cuadrado amarillo corresponde a la misma zona de las imágenes anteriores.

- **Esferas de poliestireno**

En las figuras x.1 y x.2 se muestran imágenes de SFM y de epi-fluorescencia de esferas de polietireno de 300 nm de diámetro marcadas con Dil. Este marcador tiene su banda de absorción centrada en 549 nm y la de emisión en 565 nm. Para realizar la imagen de fluorescencia se ha utilizado un juego de filtros adecuado para este marcador (ALPHA Vivid: XF108-2) [OmegaFilters]. Se puede ver como la imagen de SFM y la de epi-fluorescencia corresponden a la misma zona. En la figura x (c) se muestra una imagen combinada de epi-fluorescencia con campo claro. Esta combinación permite observar la sombra de la micropalanca sobre la muestra y de esta forma localizar la zona de medida al mismo tiempo que calibrar la imagen óptica con la anchura del fleje. Las imágenes ópticas se han adquirido con una cámara réflex EOS 550D [Canon].

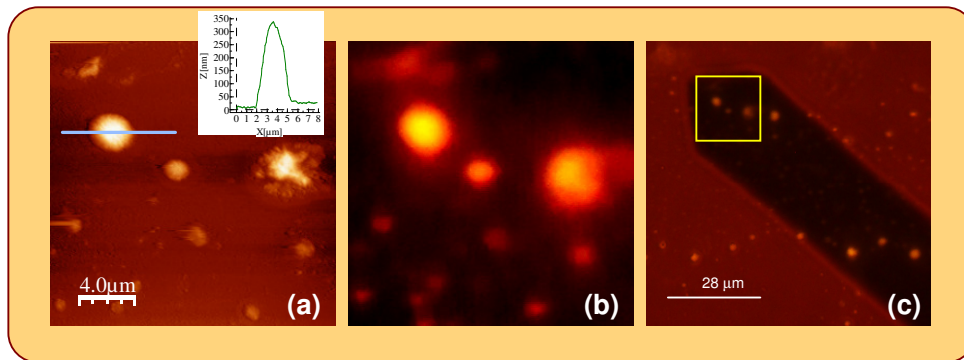


Figura 4.16. (a) Imagen de topografía de SFM de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ de esferas de poliestireno de 300 nm de diámetro marcadas con Dii adquirida en AM-DSFM. El recuadro de la imagen muestra un perfil de una de estas esferas; (b) imagen óptica en epi-fluorescencia de las mismas esferas medidas en la imagen (a); (c) Imagen de epi-fluorescencia y campo claro. El cuadrado amarillo corresponde a la zona de las imágenes (a) y (b).

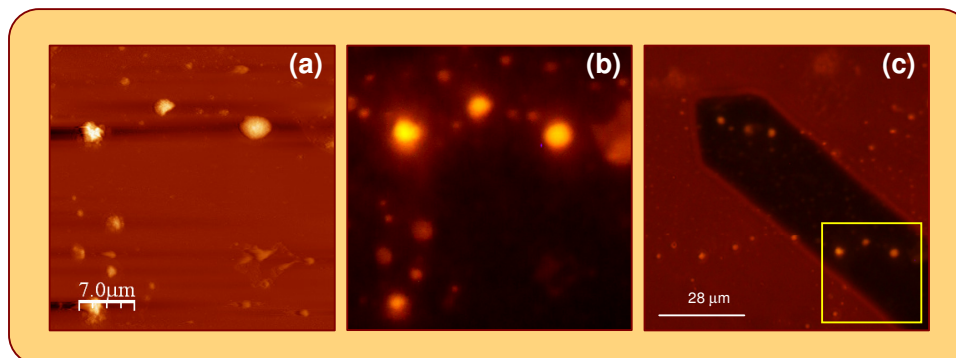


Figura 4.17. (a) Imagen de topografía de SFM de $35 \times 35 \mu\text{m}^2$ de esferas de poliestireno de 300 nm de diámetro marcadas con Dii adquirida en AM-DSFM. (b) Imagen óptica en epi-fluorescencia de las mismas esferas medidas en la imagen (a); (c) Imagen de epi-fluorescencia y campo claro. El cuadrado amarillo corresponde a la zona de las imágenes (a) y (b).

- **Sistema de temperatura variable**

Para comprobar el funcionamiento del módulo de temperatura variable descrito en el apartado 4.1 acoplado al SFM-2, se ha realizado un experimento a temperatura variable sobre una muestra de P3OT depositada sobre vidrio. En este caso, se ha utilizado un portamuestras para un cubre-objetos con diámetro de 12 mm en lugar de una placa Petri. En la figura 4.18 se puede observar el montaje con el módulo Peltier en la parte inferior, encima el portamuestras y sobre éste la muestra. Este portamuestras permite variar la temperatura ya que va acoplado al módulo Peltier y se fija al SFM-2 por medio de imanes al igual que los portamuestras estándar, aunque en este caso el portamuestras es de aluminio en lugar de fibra de carbono, por ser mejor conductor de la temperatura.

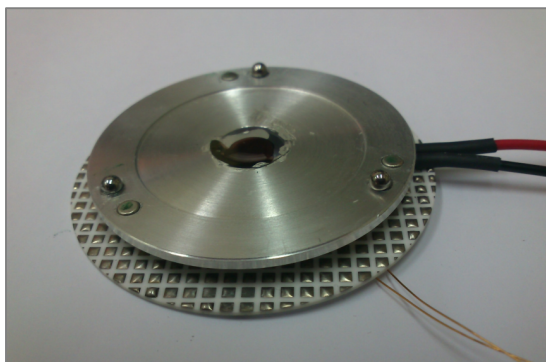


Figura 4.18. Montaje del sistema de temperatura variable para una muestra depositada sobre un cubre-objetos. Los cables rojo y negro que se ven en la figura corresponden a la alimentación de módulo Peltier, mientras que los cables finos de cobre pertenecen al sensor de temperatura situado en la parte inferior del portamuestras.

Como se ha visto anteriormente y será discutido más extensamente en el capítulo 5, las películas delgadas delgadas de P3OT presentan estructuras lamelares en la superficie. En un estudio previo, utilizando un sistema de temperatura variable diseñado y desarrollado también por nosotros acoplado a microscopio convencional de Nanotec Electrónica, ya se había caracterizado este tipo de muestras. En ese trabajo previo [López-Elvira2011] se encontró que a temperaturas alrededor de 35-45°C el P3OT sufre una transición de fase volviéndose más blando y viscoso. Por encima de esta temperatura, las islas lamelares que se encuentran en la superficie del polímero a temperatura ambiente desaparecen dando lugar a una amorfización del polímero.

Además se observaba que este proceso es reversible y las estructuras lamelares se vuelven a formar cuando la muestra se enfría.

En la figura 4.19 se muestran las imágenes de variación de frecuencia adquiridas a diferentes temperaturas. Tal como se había descrito previamente, se puede observar que al aumentar la temperatura, las islas lamelares van desapareciendo paulatinamente. Así a $T=35^{\circ}\text{C}$ vemos como hay zonas que comienzan a desaparecer. Las más representativas aparecen señalizadas por los círculos azules. A $T=40^{\circ}\text{C}$ las zonas que aparecían en los círculos azules ya han desaparecido totalmente o casi por completo, a la vez que otras zonas (marcadas con círculos amarillos) comienzan a desaparecer. A $T=45^{\circ}\text{C}$ las zonas que estaban remarcadas en amarillo ya han desaparecido y continúan desapareciendo nuevas zonas (círculos verdes). A $T=50^{\circ}\text{C}$ continúa la desaparición de las islas y a partir $T=55^{\circ}\text{C}$ se produce una modificación del polímero que produce una inversión en el contraste del canal de frecuencia en las zonas donde se localizaban las islas.

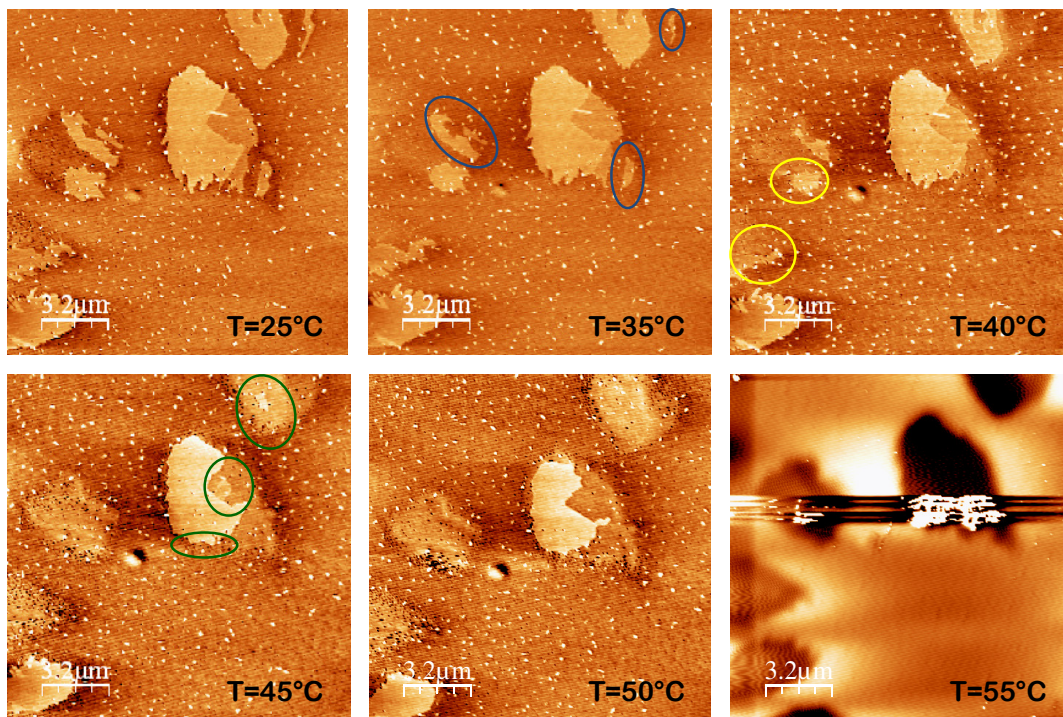


Figura 4.19. Secuencia de imágenes de variación de frecuencia en función de la temperatura aplicada sobre una muestra de P3OT depositada sobre vidrio. En la secuencia se puede apreciar como las estructuras lamelares desaparecen al aumentar la temperatura. Las imágenes se han adquirido en modo AM-DSFM. La escala en z es de 350 Hz.

4.4. Sistema de barrido z que actúa sobre la punta del SFM

Hasta ahora hemos visto como, mientras la punta permanece fija, el barrido del SFM lo realiza un sistema piezoeléctrico que actúa sobre la muestra en las direcciones xy y solidario a éste hay tres piezoescaneres que desplazan la muestra en la dirección z . El primer conjunto o juego de piezoeléctricos que se montó realiza un barrido nominal de 80 micras en xy y 8 micras en z . Para poder medir con el SFM muestras de mayor tamaño, que se observan normalmente con un microscopio óptico, como pueden ser las células, se ha integrado en el microscopio de fuerzas un conjunto de piezoeléctricos que permiten obtener imágenes de 200 micras en xy y 20 en z .

Sin embargo las características técnicas del piezoeléctrico que realiza el movimiento en xy , derivadas principalmente de su geometría y su tamaño hacen que la adquisición de medidas en modo jumping deba ser lenta para evitar que el sistema piezoeléctrico entre en resonancia y se produzcan vibraciones que perjudican la calidad de las imágenes, debido a la baja frecuencia de resonancia del piezoescáner y a la velocidad del desplazamiento en z del modo de adquisición. Con el fin de poder adquirir imágenes en modo jumping a mayor velocidad se ha implementado un sistema de barrido en el eje z que desplaza la punta respecto de la muestra, de manera que el salto o desplazamiento vertical que se realiza en este modo de medida para ir de un punto a otro de la muestra lo realiza la punta acercándose y alejándose respecto a ésta, mientras la muestra realiza el desplazamiento en el plano xy pero permanece fija en z . También se pueden utilizar de manera combinada ambos desplazamientos piezoeléctricos en z aprovechando las ventajas de cada uno de ellos, como se verá más adelante. Además también disponemos de dos conjuntos compatibles e intercambiables, de piezoescáneres situados en la pieza a la que se fija la punta. Según las características de la muestra a estudiar, se emplea el que realiza un desplazamiento en z de 2 micras, o el segundo juego que permite desplazar en el eje vertical hasta 6 micras.

4.4.1 Fundamento teórico

Como ya se ha visto anteriormente en el diseño experimental, el sistema de barrido en z formado por 3 piezoeléctricos permanece anclado al sistema piezoeléctrico xy de forma que el sistema que escanea en z es solidario al que

desplaza la muestra en xy . El objetivo de este desarrollo consiste en desacoplar el movimiento z del xy con el fin de evitar las vibraciones originadas por el sistema piezoeléctrico que desplaza verticalmente la muestra sobre el sistema de barrido en xy y finalmente sobre la muestra puesto que ambos se encuentran unidos. Este efecto es más apreciable cuanto mayor es la velocidad de barrido y el desplazamiento en z .

4.4.2 Desarrollo instrumental

Este desarrollo es totalmente compatible con el SFM mostrado en la parte experimental, ya que tan solo supone la modificación de dos piezas. Puesto que el anclaje de este nuevo desarrollo al resto del microscopio es semejante en ambos casos, se pueden utilizar indistintamente en función de las necesidades del experimento, tanto el portapuntas que tiene sistema piezoeléctrico como el que no. Tal como ya se ha mostrado, el portapuntas se fija por medio de imanes a la plataforma que se desplaza en el eje vertical, de forma que se puede montar y desmontar fácilmente para realizar el cambio de punta. Como se puede ver en la figura 4.20, en este nuevo diseño el antiguo portapuntas (pieza verde en la imagen izquierda) se divide en dos piezas (roja y amarilla en la imagen derecha). Por un lado la pieza roja se une a la pieza superior por medio de los piezoeléctricos que realizarán el desplazamiento en z y la pieza amarilla es el nuevo portapuntas, más pequeño y ligero que el anterior (pieza verde). Además estas dos nuevas piezas (figura 4.21) están fabricadas en fibra de carbono [Carbon-Composite] para disminuir el peso y por tanto mejorar el comportamiento dinámico ya que se puede elevar la velocidad de barrido al aumentar la frecuencia de resonancia del sistema.

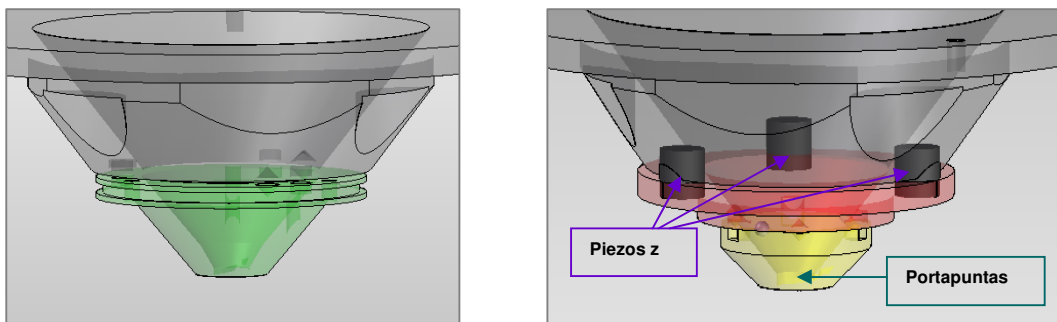


Figura 4.20. Diseños por ordenador del portapuntas convencional (izquierda) y del sistema de barrido de la punta en el eje z (derecha). Las piezas se muestran semitransparentes para que se pueda apreciar la colocación de los piezoeléctricos.

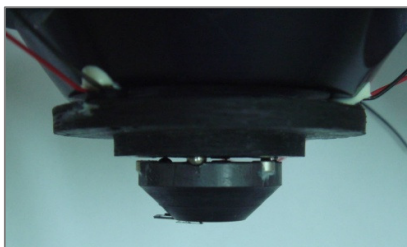


Figura 4.21. Imagen del montaje experimental del barrido z que actúa sobre la punta. La pieza superior que permanece fija es de aluminio anodizado, mientras que las dos inferiores que tiene que mover el sistema de barrido en z, son de fibra de carbono para que sean más ligeras.

4.4.3 Resultados

Para comprobar el funcionamiento y cuantificar la mejora que supone desacoplar el desplazamiento z del xy, se han realizado unas medidas comparativas en modo dinámico, en jumping y en modo contacto, empleando en un caso el sistema de barrido convencional acoplado al piezoescáner xy (80x 80 micras) que mueve la muestra 8 micras en el eje z manteniendo fija la punta, y en el otro caso el sistema experimental con 2 micras de rango que desplaza la punta manteniendo fija la muestra en el eje vertical. Para ello se han adquirido simultáneamente la topografía y la señal de error o canal que se utiliza para el sistema de retroalimentación (esto es, la fuerza normal en los modos de contacto y jumping o la amplitud en modo dinámico con modulación de amplitud AM-DSFM) para una misma velocidad de 2 minutos por imagen (frecuencia de barrido de 1 Hz) y se ha obtenido el valor cuadrático medio (RMS) de la señal de error. Este valor nos permite comparar con que precisión el sistema de realimentación sigue, en cada caso, la topografía de la muestra. La señal de error debe ser lo más plana posible, con lo que el valor RMS de esta señal sería idealmente cero, por lo tanto, cuanto menor es el valor RMS de la señal de error, más se ajusta la imagen de topografía al relieve real de la muestra.

En todos los casos se han adquirido imágenes de un patrón de calibración formado por barras con una periodicidad de 3 μm y una altura de 17.9 nm. Las imágenes son de 128 puntos por 128 puntos con un tamaño de barrido de 8 μm por 8 μm en xy.

- **Modo contacto**

En la figura 4.22 se muestran las imágenes de topografía y fuerza normal adquiridas en modo contacto con el nuevo sistema de piezoeléctricos que actúan

sobre la punta en las imágenes superiores y con los que desplazan la muestra en las imágenes inferiores. El valor RMS de la fuerza normal en el primer caso es de 3.3 mV, mientras que en el segundo es de 11.2 mV, de manera que a la misma velocidad de barrido, utilizando el sistema piezoeléctrico que actúa sobre la punta y que está desacoplado del barrido xy , la señal de error es 3,4 veces menor y por tanto la topografía se ajusta mejor a la orografía de la muestra que si se emplea el barrido z solidario al desplazamiento xy .

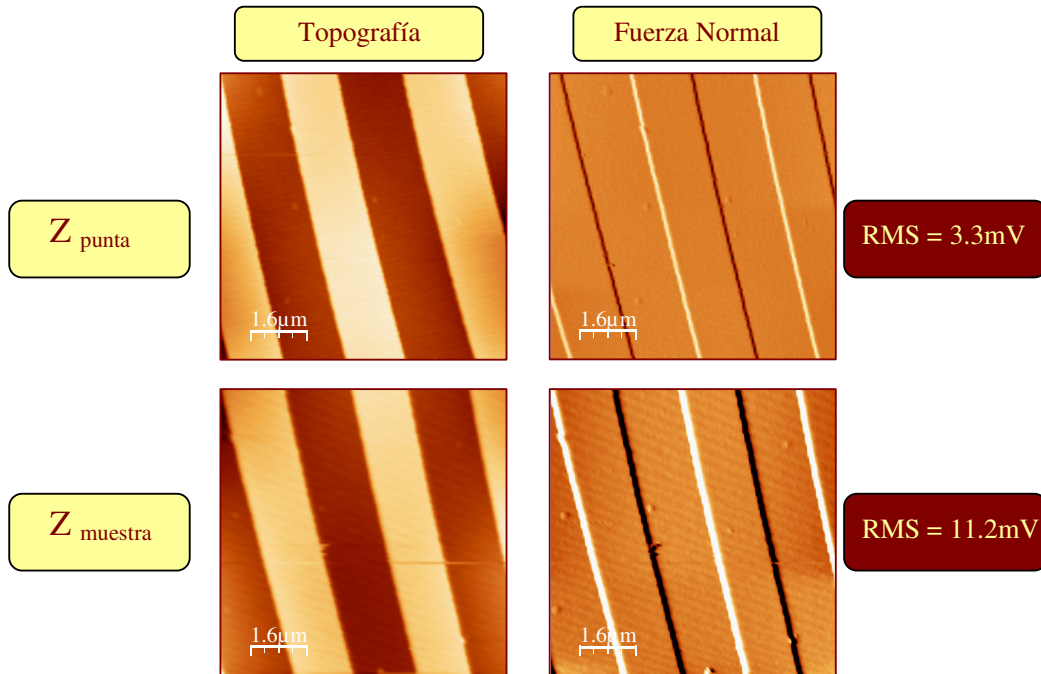


Figura 4.22. Imágenes de topografía y fuerza normal de 8×8 micras de un patrón de calibración con altura de 17.9 nm, adquiridas en modo contacto con una frecuencia de barrido de 1 Hz. Las imágenes superiores se han adquirido con el nuevo sistema piezoeléctrico que actúa sobre la punta, mientras que las imágenes inferiores se han adquirido con el piezoescaner que actúa sobre la muestra

- **Modo jumping**

En la figura 4.23 se muestran las imágenes adquiridas en modo jumping de topografía y fuerza normal con el sistema piezoeléctrico que mueve la punta en el primer caso y con los piezoescáneres que desplazan la muestra en el segundo. El valor RMS de la señal de error en el primer caso es de 5.8 mV, mientras que en el segundo es de 17.8 mV. Al igual que en el caso anterior la imagen de la señal de error es más plana utilizando el piezoescaner que mueve verticalmente la punta, siendo ahora la magnitud 3.1 veces menor frente al barrido en z de la muestra. En este caso

también se aprecia la mejora ya que el desplazamiento en z a gran velocidad que realiza el modo jumping hace que oscile el piezoescaner xy cuando dicho desplazamiento vertical lo realiza el conjunto piezoeléctrico que está solidario con la muestra, mientras que al barrido xy, y por tanto a la calidad de la imagen, no le afectan los saltos en z si se realizan con el sistema piezoeléctrico de la punta que está desacoplado del barrido xy. La mejoría es mayor cuanto mayor es la velocidad de adquisición de la imagen.

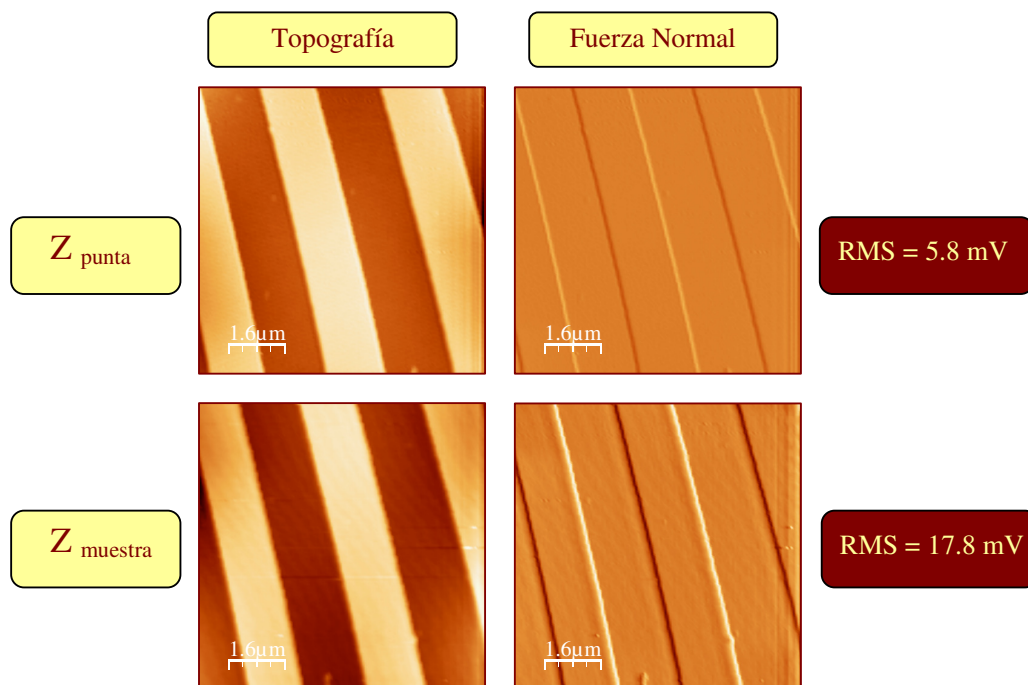


Figura 4.23. Imágenes de topografía y fuerza normal de 8 x 8 micras de un patrón de calibración con altura de 17.9 nm adquiridas en modo jumping a una velocidad de 5 minutos por imagen, lo que equivale a una frecuencia de barrido de 0,4 Hz. Los parámetros empleados para obtener esta velocidad son: jump off = 100 nm, jump sample = 100 y control cycles = 10. Las imágenes superiores se han adquirido con el nuevo sistema piezoeléctrico que actúa sobre la punta, mientras que las imágenes inferiores se han adquirido con el piezoescaner que actúa sobre la muestra. .

- **Modo dinámico con modulación de amplitud AM-DSFM**

Finalmente comparamos ambos sistemas de barrido en z, realizando las medidas anteriores en modo dinámico con modulación de amplitud. También en este caso, como se puede apreciar en la figura 4.24, el valor RMS de la señal de error, que en este caso es la amplitud de oscilación, es menor al utilizar el sistema piezoeléctrico

situado en la punta frente al situado en la muestra. En este caso la mejora es casi un factor 5.

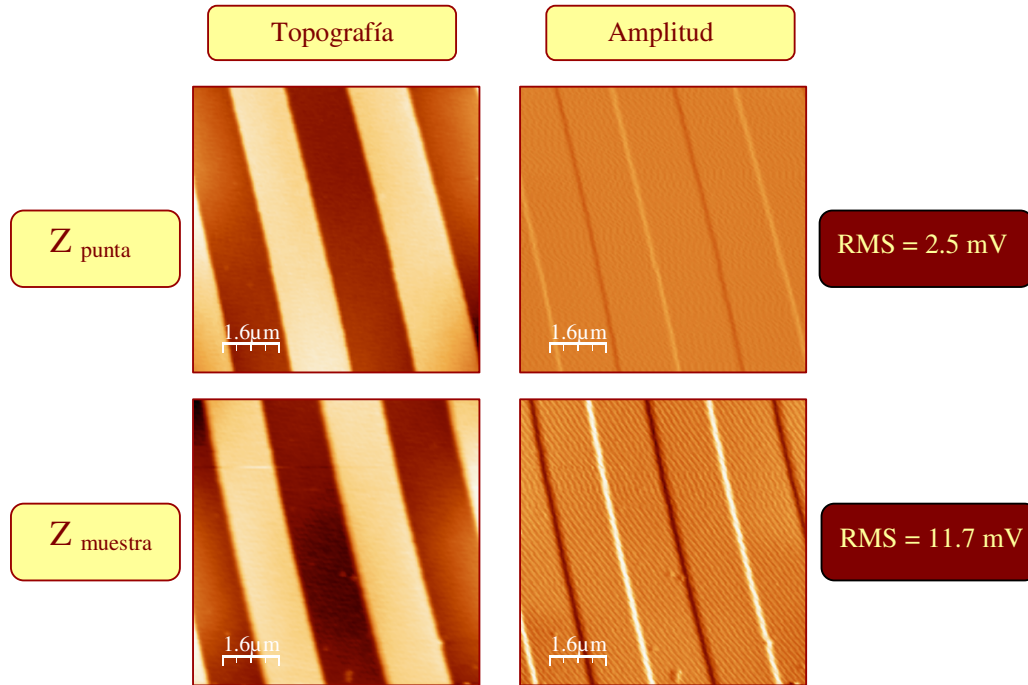


Figura 4.24. Imágenes de topografía y amplitud de 8×8 micras de un patrón de calibración con altura de 17.9 nm , adquiridas en modo dinámico a una velocidad de 2 minutos por imagen. Las imágenes superiores se han adquirido con el nuevo sistema piezoeléctrico que actúa sobre la punta, mientras que las imágenes inferiores se han adquirido con el piezoescáner que actúa sobre la muestra. La escala en z de la topografía es de 30 nm y la de la amplitud es de 100 mV .

- **Imágenes a máxima velocidad**

Hemos visto en el experimento anterior como realizando imágenes a una velocidad prefijada, la señal de error varía en función de lo rápido o lento que sea el sistema piezoeléctrico. A continuación vamos a realizar medidas a la máxima velocidad que nos permita tanto el modo de medida como el sistema piezoeléctrico empleado, manteniendo una calidad aceptable de la imagen de topografía. Estas medidas por tener una calidad de imagen semejante tendrán un valor RMS de la señal de error similar y así podremos comparar a un valor quasi-constante de la desviación de la señal de retroalimentación las imágenes adquiridas en cada caso con la máxima velocidad posible. Los resultados aparecen recogidos en la figura 4.25. Como podemos ver en dicha figura el valor RMS en las imágenes adquiridas en contacto y en tapping está entorno a 35 mV . Empleando el sistema piezoeléctrico de la punta en

dichos modos de adquisición la velocidad de barrido es de 4 segundos por imagen (32 Hz), mientras que utilizando el piezoeléctrico que actúa sobre la muestra la máxima velocidad de barrido en modo contacto es de 16 segundos por imagen (8 Hz) y en modo dinámico es de 32 segundos por imagen (4 Hz). En modo jumping no se puede seleccionar directamente la frecuencia de barrido; el tiempo que tarda en adquirirse una imagen viene determinada por los parámetros que controlan el jumping, que son: la distancia que se aleja de la muestra para realizar el desplazamiento lateral (*jump off*), el número de pasos tomados en cada salto (*jump samples*) y el tiempo que pasa la punta en contacto con la muestra haciendo feedback (*control cycles*). En este modo de medida ajustamos dichos parámetros al mínimo posible mientras la calidad de la imagen sea aceptable y del tiempo que tarda en adquirirse la imagen sacamos la frecuencia de barrido.

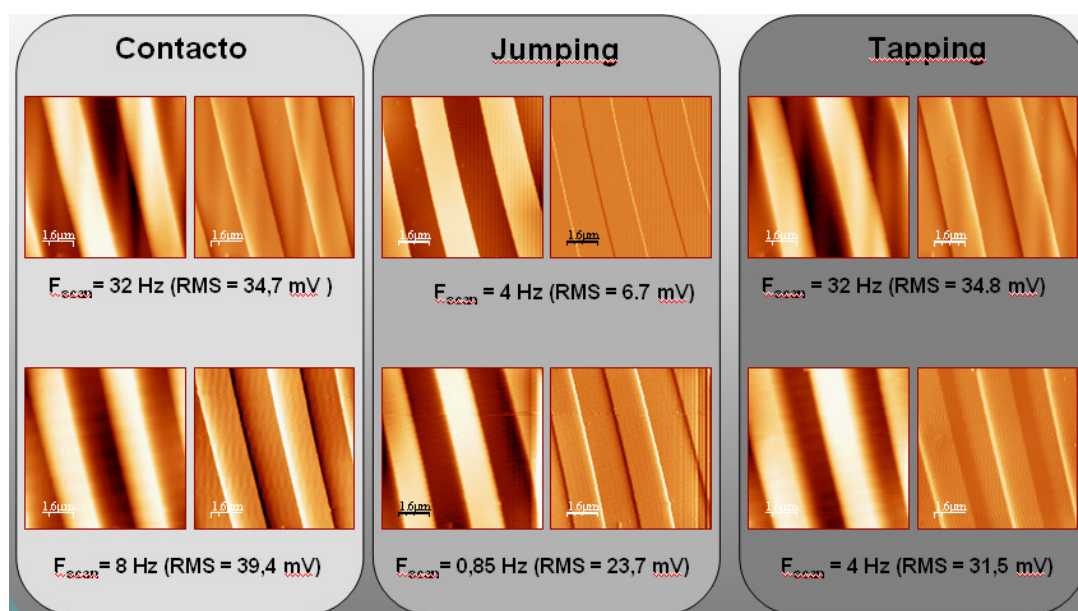


Figura 4.25. Imágenes de topografía y señal de error adquiridas a la máxima velocidad posible en cada caso. Las imágenes de arriba se han adquirido con el sistema piezoeléctrico de la punta y las de abajo con el de la muestra. A la izquierda imágenes en modo contacto, en el centro en modo jumping y a la derecha en modo dinámico.

La imagen adquirida con el piezoescaner de la muestra se ha tomado a una velocidad de 2,5 minutos por imagen (equivalente a 0,85 Hz) obteniendo un valor RMS de la fuerza normal de 23,7 mV. Utilizando el piezoescaner de la punta, se ha mantenido la misma distancia de salto que en el caso anterior y se han reducido los otros dos parámetros al mínimo que permite el software de adquisición. La velocidad a

la que se ha tomado la imagen es de 32 segundos por imagen (equivalente a 4 Hz) y el valor RMS de la señal de error es de tan solo 6,7 mV.

Por último podemos ver la calidad de una imagen adquirida en 1 segundo en modo contacto y en 5 segundos en modo jumping. La figura 4.26 muestra una imagen de $8\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$ adquirida en modo contacto a 64 Hz con 64 puntos. El valor RMS de la fuerza normal es de 38.4 mV. La figura 4.27 muestra una imagen de $8\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$ adquirida en modo jumping con 64 puntos adquirida en 5 segundos. El valor RMS de la fuerza normal es de 21,5 mV. A pesar de que la calidad de las imágenes no es demasiado buena, se puede distinguir perfectamente la orografía de la muestra, formada por escalones rectangulares de 17.9 nm de altura y periodicidad de 3 micras.

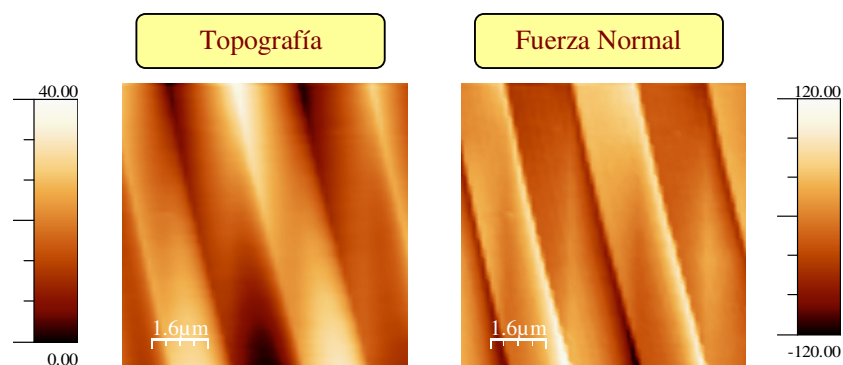


Figura 4.26. Imágenes del patrón de calibración adquiridas en modo contacto a velocidad de 1 segundo por imagen utilizando el sistema piezoeléctrico que actúa sobre la punta. A la izquierda se muestra la imagen de topografía con su respectiva escala en z medida en nanómetros y a la derecha la imagen de la señal de error (fuerza normal) con su escala en mV

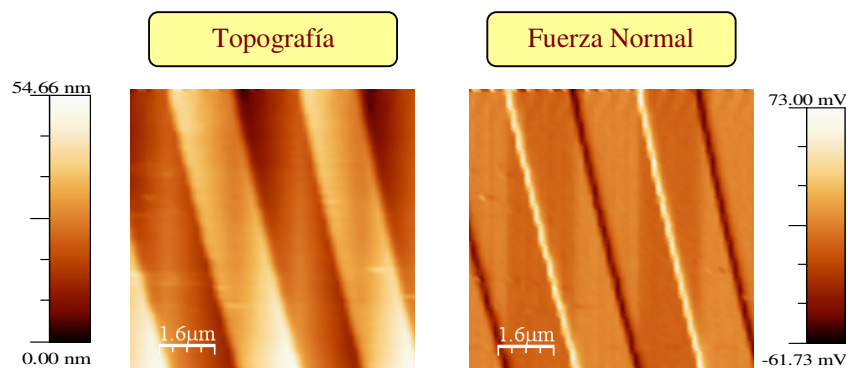


Figura 4.27. Imágenes del patrón de calibración adquiridas en modo jumping a velocidad de 5 segundos por imagen utilizando el sistema piezoeléctrico que actúa sobre la punta. A la izquierda se muestra la imagen de topografía con su respectiva escala en z medida en nanómetros y a la derecha la imagen de la señal de error (fuerza normal) con su escala en mV. Los parámetros del jumping empleados para obtener esta velocidad de barrido son: jump off = 40 nm, jump sample = 4 y control cycles = 4.

4.4.4 Medidas con dos sistemas piezoeléctricos en z

Las medidas realizadas en el apartado anterior se han llevado a cabo conectando o bien el piezoeléctrico de la punta o bien el de la muestra, sin embargo disponiendo de dos sistemas de barrido en z, es posible utilizarlos simultáneamente, bien para sumar sus rangos de barrido o bien para aprovechar al mismo tiempo las ventajas de ambos, esto es, la rapidez que ofrece uno y el amplio rango en z que ofrece el otro.

La electrónica de control del SFM dispone de una fuente de alto voltaje para alimentar los piezoeléctricos de manera que éstos puedan realizar el rango completo de su desplazamiento nominal. Esta fuente tiene tanto voltaje positivo como negativo, ya que los piezoeléctricos tubulares tradicionales empleados en SFM son bipolares. Con la colaboración de Nanotec Electrónica, se han llevado a cabo modificaciones tanto en la unidad de control como en el programa de adquisición y procesado de imágenes WSxM. Se ha protegido la electrónica de control impidiendo que aplique voltajes negativos, para evitar una posible despolarización de los piezoeléctricos empleados que son unipolares. Para ello se han separado las señales de +z y -z procedentes de la electrónica, aunque en este caso ambas tienen voltajes positivos, como acabo de indicar, por el hecho de emplear piezoeléctricos unipolares.

Una vez que están conectados ambos sistemas piezoeléctricos, Nanotec Electrónica ha realizado las modificaciones en su programa WSxM de manera que nos permite poder medir con cada uno de ellos por separado o de manera conjunta. En la figura 4.28 se muestra el menú del sistema piezoeléctrico que contiene cuatro modos de trabajo. Dos modos individuales, que permiten medir sólo con uno u otro de manera independiente y dos modos combinados que utilizan ambos sistemas de barrido simultáneamente. Para el correcto funcionamiento simultáneo de los dos sistemas piezoeléctricos hay que introducir en el programa los valores de calibración de cada uno de los piezoescáneres empleados, así como sus rangos operativos de voltaje.

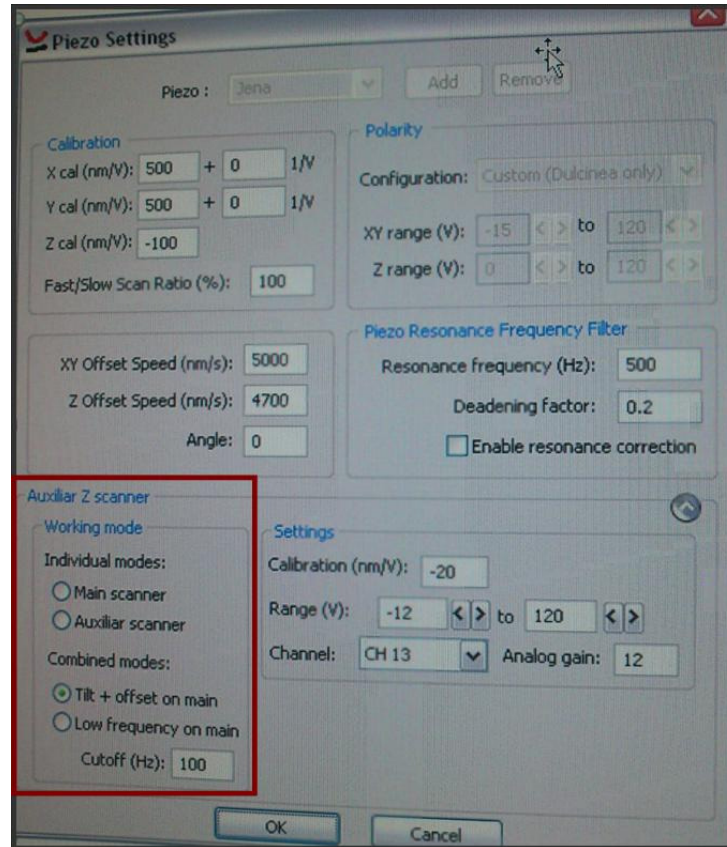


Figura 4.28. Menú del sistema piezoeléctrico del software WSxM en el que se muestran los cuatro modos de trabajo con los dos sistemas de barrido en z. En la parte superior del recuadro rojo aparecen los dos modos individuales, que permiten medir con uno u otro de forma independiente. En la parte inferior del recuadro están los dos modos combinados, que permiten medir con ambos piezoescáneres de manera simultánea.

Primer modo individual: Este primer modo de trabajo permite utilizar de manera exclusiva el piezoeléctrico que actúa sobre la muestra. Esta es la manera estándar de funcionamiento de cualquier SFM convencional que escanea la muestra y no la punta. Como ya hemos visto este sistema de barrido tiene mayor rango pero es más lento debido fundamentalmente a su gran tamaño, que hace que tenga una frecuencia de resonancia baja.

Para probar este primer modo se han medido esferas de poliestireno de 10 micras de diámetro (figura 4.29). Para ello se ha utilizado el sistema piezoeléctrico con 20 μm de rango en z. Las medidas se han realizado al aire en modo dinámico en modulación de amplitud AM-AFM.

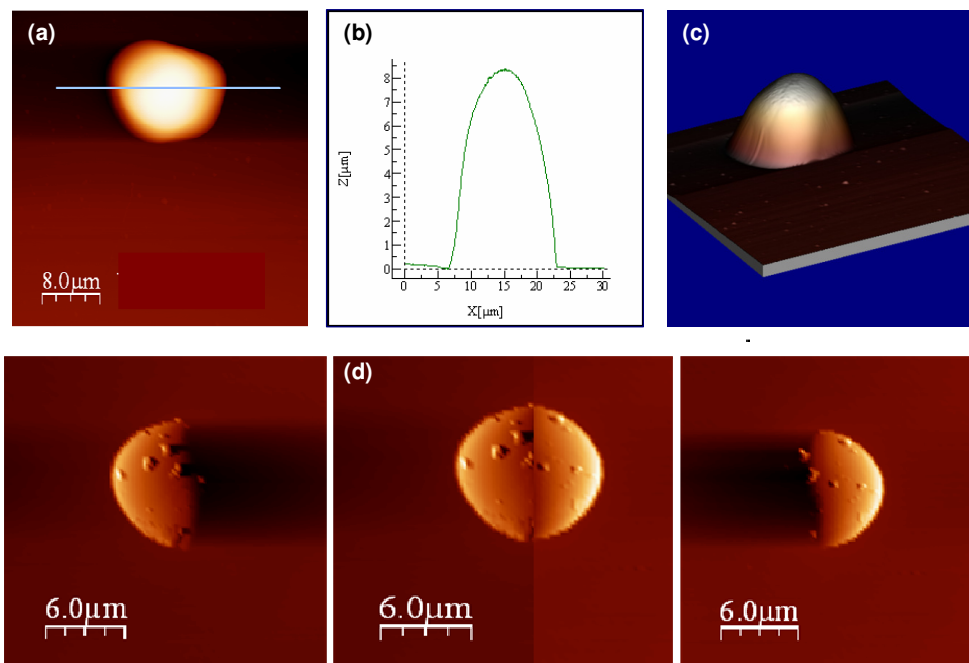


Figura 4.29. Imágenes de AFM de esferas de poliestireno de $10\ \mu\text{m}$ de diámetro medidas en AM-AFM. a) Imagen de topografía. b) Perfil de la esfera obtenido de la línea azul mostrada en la imagen a). c) Imagen de topografía representada en tres dimensiones. d) Imágenes de amplitud de una esfera de poliestireno. A la izquierda se muestra la imagen adquirida en el barrido de ida (dirección $+x$) y a la derecha se muestra la imagen a la vuelta (dirección $-x$). La imagen central corresponde a la unión de las dos anteriores para dar lugar a la esfera completa. Las imágenes se han adquirido con una frecuencia de barrido de $0.25\ \text{Hz}$ y tienen 512 puntos.

Segundo modo individual: Este modo de medida es el que se ha expuesto a lo largo de este apartado que permite realizar las medidas utilizando el piezoeléctrico que actúa sobre la punta, con todas las ventajas que, como ya se ha mencionado anteriormente, ofrece respecto al piezoescáner de la muestra, derivadas de su menor rango y tamaño que le confieren mayores frecuencias de resonancia y por tanto mejor respuesta dinámica.

Primer modo combinado: En este modo de trabajo se utiliza el piezoeléctrico más rápido (que hemos visto en el apartado anterior que es el de la punta) para aplicar la señal de retroalimentación (*feedback*), mientras que el piezoeléctrico de la muestra que es más lento realiza el desplazamiento necesario para corregir la inclinación de la muestra (*“tilt”*) y además el piezoescáner de la punta puede funcionar dentro de todo el rango del piezoeléctrico de la muestra, lo que se denomina como *offset*. En este caso la altura de las muestras a medir debe ser inferior al rango del piezoescáner de la

punta, ya que es el que realiza el *feedback*. Una ventaja respecto a utilizar sólo el sistema de barrido que actúa sobre la punta, es que ahora se pueden hacer imágenes de gran tamaño sin que la inclinación de la muestra deje sin rango el piezoeléctrico de la punta, ya que ahora lo realiza el sistema de barrido z de la muestra. Otra ventaja es que el microscopio puede estar más tiempo de medida sometido a derivas térmicas sin salirse del rango en z, ya que este desplazamiento vertical lo realiza el piezoescáner de la muestra.

Para probar este modo de trabajo incluido en el programa se han medido esferas de poliestireno de 2 micras de altura (figura 4.30). Se han utilizado los piezoeléctricos con rangos de 20 μm en la muestra y 6 μm en la punta.

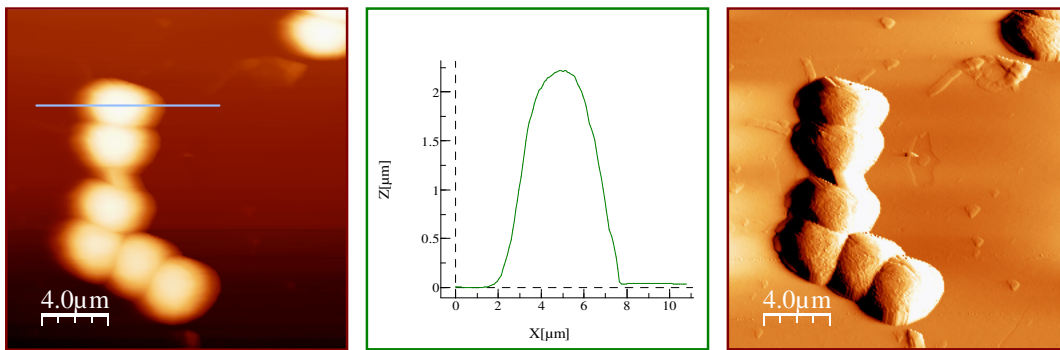


Figura 4.30. Imágenes de AFM de esferas de poliestireno de 2 μm de diámetro. La imagen de la izquierda corresponde a la topografía. El perfil de la imagen central se ha obtenido de la línea azul en la imagen de topografía. A la derecha la imagen de amplitud. Las imágenes tienen 256 puntos y se han adquirido a una frecuencia de barrido de 0,5 Hz.

Segundo modo combinado: Este modo utiliza ambos piezoeléctricos como señal de retroalimentación y por tanto tiene la ventaja de combinar por una parte la velocidad de barrido del piezoeléctrico de punta con el amplio rango del piezoeléctrico de la muestra. Por medio de un filtro paso-bajo se separan las bajas y altas frecuencias. Las bajas frecuencias se envían al piezoeléctrico que actúa sobre la muestra, mientras que las altas frecuencias se envían al piezoeléctrico que mueve la punta. Por medio de un parámetro que determina la frecuencia de corte, se puede elegir la contribución de cada sistema de barrido. De esta manera, si el valor de la frecuencia de corte está cercano a cero, apenas habrá señal de bajas frecuencias que se envíe al piezoeléctrico de la muestra, con lo que el sistema de retroalimentación lo realizará casi exclusivamente el piezoeléctrico de la punta. Por el contrario si el

parámetro que determina la frecuencia de corte es elevado el barrido en z lo realizará en gran medida el piezoeléctrico de la muestra.

Para comprobar el correcto funcionamiento de este modo de trabajo se han medido esferas de poliestireno de 10 micras de altura (figura 4.31). Al utilizar de manera combinada ambos sistemas de barrido en z, tenemos el rango suficiente para medir la altura total de las esferas, gracias al piezoeléctrico de la muestra, de 20 μm , y gracias al piezoescáner de la punta, de 6 μm de rango, podemos realizar un feedback más rápido y por tanto obtener más detalles de la topografía de la muestra.

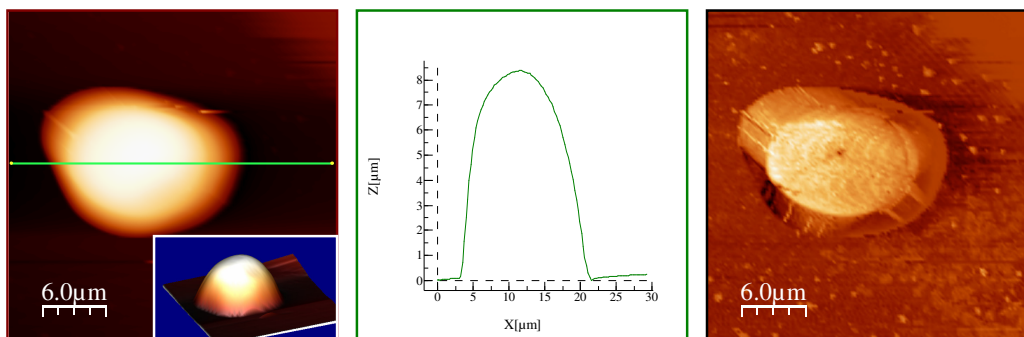


Figura 4.31. Imágenes de AM-AFM de esferas de poliestireno de 10 μm de diámetro. A la izquierda se muestra la imagen de topografía. En la imagen interior aparece la representación en tres dimensiones. De la línea verde se obtiene el perfil de la esfera mostrado en la figura central. A la derecha se muestra la imagen de amplitud, que corresponde a la señal de error. Las imágenes tienen 128 puntos y se han adquirido a una frecuencia de barrido de 0,5 Hz.

4.5 Referencias

- | | |
|-----------------------------|--|
| [APC] | www.americanpiezo.com |
| [Canon] | www.usa.canon.com |
| [Carbon-Composite] | www.carbon-composite.com |
| [Global Component Sourcing] | www.gcshk.net |
| [Hamamatsu] | www.hamamatsu.com |

[Lopez-Elvira2011]	López-Elvira, E.; Garcia-Perez, B.; Colchero, J.; Palacios-Lidón E. Surface characterization of P3OT thin films by variable temperature scanning force microscopy. <i>Synthetic Metals</i> 161 (15-16) 1651 (2011).
[Mitutoyo]	www.mitutoyo.com/
[OmegaFilters]	www.omegafilters.com
[PI]	www.physikinstrumente.com/
[PiezoJena]	www.piezosystem.com
[Schäfter-Kirchhoff]	www.sukhamburg.com
[Schneeberger]	www.schneeberger.com

Capítulo 5. Fenómenos fotoinducidos en polímeros conductores combinando KPM y microscopía óptica

5.1. Motivación y objetivos

Entender los procesos fotoinducidos, es decir procesos que tienen lugar cuando los materiales son iluminados, es primordial, ya que estos fenómenos determinan el funcionamiento de los dispositivos optoelectrónicos indispensables en nuestra vida cotidiana. A medida que la tecnología avanza y que los dispositivos son cada vez más y más pequeños, la escala relevante a la que tienen lugar estos procesos también disminuye, siendo en la actualidad del orden de los nanómetros.

Para estudiar los fenómenos inducidos por luz a escala nanométrica, son necesarias técnicas de caracterización que permitan medir tanto la morfología como las propiedades electrónicas con resolución nanométrica simultáneamente con las propiedades ópticas. Ya que estos requisitos técnicos se obtienen mediante la combinación de microscopía Kelvin con microscopía óptica tradicional y técnicas de espectroscopía, nuestro SFM-MO se perfila como un candidato ideal para dicha caracterización.

Ésta es precisamente la aproximación experimental de este capítulo, en el cual se estudian los procesos fotoinducidos que tienen lugar en películas delgadas de P3OT depositadas por centrifugación en sustratos de óxido de indio y estaño sobre tereftalato de polietileno (ITO:PET del inglés *Indium tin oxide* y *Poly-Ethylene Terephthalate*), mediante la implementación del SFM-I con técnica KPM en un microscopio óptico invertido.

Ya que el diseño del microscopio combinado SFM-MO permite iluminar la muestra con diferentes longitudes de onda y distintas intensidades, mientras se realizan simultáneamente los experimentos de SFM/KPM, se pueden monitorizar “in situ” los procesos inducidos por la luz, registrando los cambios en la topografía y en el potencial de contacto. Comparando estos resultados con las imágenes obtenidas con el microscopio óptico (micrografías) podemos establecer una correlación directa entre los cambios morfológicos y de potencial de contacto (CP del inglés *Contact Potential*)

con los cambios en la densidad óptica de la muestra en función de la longitud de onda y la intensidad de la radiación empleada

Finalmente, para clarificar los procesos de degradación que están teniendo lugar, los resultados de KPM se han complementado con espectroscopía Raman, que permite conocer la composición y estructura de la muestra a nivel molecular, por medio de la dispersión inelástica sufrida por un haz monocromático. Esto ha permitido conocer qué longitud de onda es más agresiva en el proceso de degradación del polímero, así como los cambios que sufre tanto en sus propiedades ópticas, como en su morfología. Se ha encontrado que la degradación del polímero en películas delgadas de P3OT es muy sensible a la longitud de onda de la iluminación. Aunque la densidad óptica del polímero disminuye, tanto con iluminación azul como con luz ultravioleta, las medidas realizadas con KPM junto con los espectros Raman muestran que los procesos de fotodegradación son muy diferentes en ambos casos.

5.2. Introducción

En los últimos años los polímeros conductores se han estudiado para su uso en dispositivos opto-electrónicos, debido principalmente a lo económico y sencillo de su fabricación y a que ofrecen una alternativa versátil a los clásicos dispositivos optoelectrónicos de semiconductores inorgánicos. Durante la última década, se han fabricado dispositivos que emplean polímeros como los diodos emisores de luz orgánicos [Kabra2010], transistores [Chu2005], células solares [Brabec2001], etc, y que han demostrado la validez del desarrollo de elementos optoelectrónicos basados en materiales plásticos. La fiabilidad de estos dispositivos radica en la comprensión y el ajuste de sus propiedades electro-ópticas. Por lo general, estos dispositivos están compuestos por diferentes materiales tipo p y tipo n mezclados a escala nanométrica, formando una heterounión dispersa [Campbell2008]. Por tanto, los procesos físicos y químicos relevantes tienen lugar en esta escala.

Sin embargo un inconveniente importante que limita su aplicación es su baja estabilidad fotoquímica en condiciones ambientales lo que reduce la vida útil de los dispositivos [Mohammad97]. Hoy en día muchos de los esfuerzos están focalizados en incrementar su durabilidad [Jorgensen2008]. Normalmente, para evitar la degradación del polímero, los dispositivos se encapsulan y de esta forma se previene la exposición

al oxígeno y al agua [Zimmermann2009] de la atmósfera. No obstante, incluso con una óptima encapsulación, la fotodegradación no se suprime completamente ya que la absorción de luz visible y ultravioleta puede inducir en el polímero reacciones fotoquímicas directas que no implican oxígeno [Cumpston95].

De los diversos polímeros conductores que se utilizan en la actualidad, una de las familias de polímeros más utilizada en optoelectrónica es la del *poli (3-alkiltiofeno)* (P3AT) debido a su estabilidad y alta conductividad por huecos, [Roncali92, Schopf97]. La estabilidad de los P3AT se ha estudiado principalmente en disolución durante mucho tiempo [Holdcroft91, Abdou93, Abdou97, Manceau2008], pero a excepción de unos pocos trabajos más antiguos [Abdou95, Ljungqvist95], el estudio del comportamiento fotoquímico de los P3AT en estado sólido ha comenzado a tener relevancia recientemente [Manceau2009, Manceau2010, Hintz2010].

El 3-octiltiofeno está formado por un anillo de cinco miembros con un heteroátomo de azufre y una cola de ocho grupos alquilo unidos al anillo (figura 5.1). El polímero se forma mediante la unión de estas moléculas, que pueden acoplarse en forma de cabeza-cola, cabeza-cabeza o cola-cabeza. El acoplamiento cabeza-cola es más ordenado y la estructura que forma se dice que es “regioregular” u ordenada. Si presenta otro tipo de acoplamiento se dice que su estructura es “regiorandom” o desordenada.

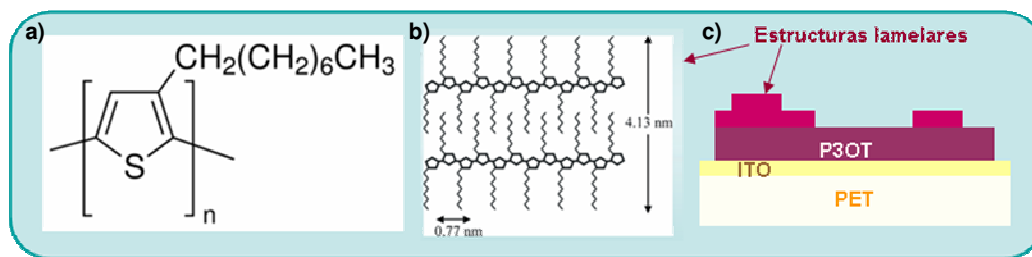


Figura 1. a) Fórmula del P3OT. b) Acoplamiento de las cadenas del polímero. c) Esquema de la lámina delgada de P3OT obtenida por centrifugación sobre el sustrato de ITO:PET. Las estructuras lamelares que sobresalen sobre la superficie del polímero corresponden a la organización cristalina de las cadenas mostrada en la figura b.

Los polialquiltiofenos, P3ATs, son polímeros semicristalinos y sus dominios cristalinos presentan estructura ortorrómbica que en el caso del P3OT tiene los parámetros de red $a=4.13$ nm, $b=0.76$ nm y $c=0.77$ nm. Convencionalmente, el parámetro a se extiende en la dirección de los brazos alquilo de la molécula, el parámetro b a lo largo de la dirección de almacenamiento de las moléculas,

perpendicular a la proyección de la figura 5.1 y el parámetro c en la dirección del eje de la molécula. El grado de cristalinidad de las muestras depende de la regularidad de los monómeros en las cadenas poliméricas y de la longitud de las cadenas así como del método de preparación.

En la figura 5.2 (a) y (b), se muestra una imagen característica de película delgada de P3OT, junto con la correspondiente imagen de CP adquirida en oscuridad, respectivamente. La imagen de topografía muestra dos zonas diferenciadas. Por un lado, la parte más baja de la muestra que está formada por polímero amorfo y por otro lado, la parte más elevada formada por estructuras lamelares de altura 4.5 ± 0.5 nm que cubren parcialmente la superficie del polímero. Estas lamelas son zonas cristalinas o semicristalinas donde la columna de la molécula se coloca paralela al sustrato y las cadenas alquilo laterales permanecen perpendiculares a él. Se puede encontrar una descripción detallada de las fases cristalinas moleculares en este tipo de polímeros dentro de las estructura lamelar en las referencias [Prosa92, Abad2008].

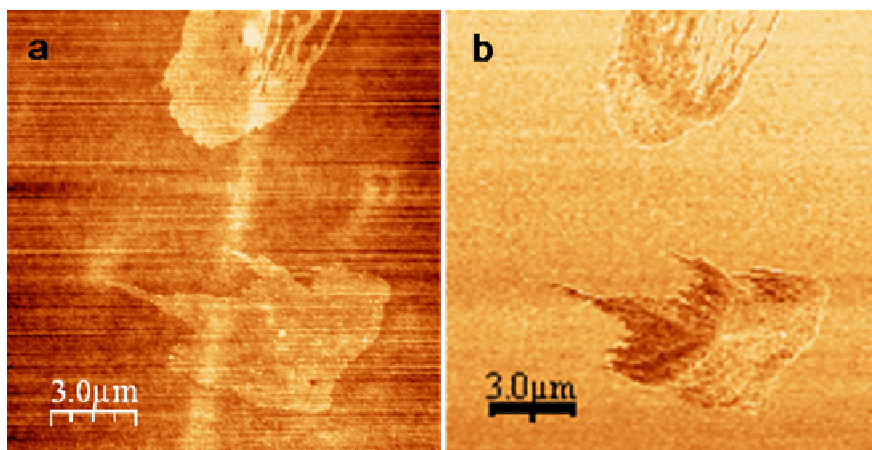


Figura 5.2. *a)* Topografía de una lámina delgada de P3OT adquirida en oscuridad, esto es, sin iluminación exterior y *b)* su correspondiente imagen de potencial de contacto.

La imagen de potencial de contacto (figura 2 b) muestra que las regiones de polímero que no están cubiertas de estructuras lamelares tienen un potencial de contacto homogéneo, mientras que las lamelas presentan diferentes dominios de potencial de contacto. En un trabajo previo se propuso que estos dominios de potencial de contacto se correlacionan con ligeras diferencias en la colocación molecular dentro de la lamela [Perez-Garcia2008].

5.3. Métodos experimentales

5.3.1 Preparación de la muestra

En este trabajo se ha empleado poli (3-octiltiofeno) (P3OT) regioregular suministrado por Sigma Aldrich con un 98,5% de acoplamiento cabeza-cola, peso molecular de $M_n=54000$ e índice de polidispersidad de $D = 2.6$.

Las películas delgadas de P3OT se han obtenido por centrifugación o *spin coating* a partir de una disolución en cloroformo (40mg/ml). En esta técnica de preparación se deposita una gota de disolución sobre el sustrato y seguidamente se acelera hasta unas 2000-3000 rpm. Durante el giro, la gota se esparce homogéneamente sobre la superficie del sustrato y se forma una lámina delgada de aproximadamente 200 nm de espesor (figura 5.1). Como sustrato se ha elegido el óxido de indio y estaño depositado sobre tereftalato de polietileno (ITO:PET). Se ha elegido este sustrato por ser un soporte transparente y conductor ideal para medidas simultáneas de microscopía óptica y KPM, respectivamente. Además es flexible, manejable y se emplea habitualmente en optoelectrónica basada en polímeros. Antes de depositar la muestra el ITO:PET se limpia exhaustivamente con isopropanol.

5.3.2 El sistema combinado: SFM + luz

Los experimentos se han realizado con el prototipo SFM-1 una vez se implementó con la técnica Kelvin. Las imágenes han sido adquiridas a temperatura ambiente en modo de modulación de amplitud con amplitudes de oscilación típicas de 5 nm. Se han utilizado micropalancas de silicio recubiertas de platino con constante de fuerza de 3N/m y frecuencia de resonancia entorno a 70 Khz. [Budget Sensor]. Se han aplicado voltajes U_{ac} de 500 mV con v_{elec} de 7 kHz. Los detalles del modo de operación KPM se describen en el apartado 2.2.4 y de manera más extensa en [Palacios-Lidón2006].

En esta ocasión, el SFM-1 se ha acoplado a un microscopio óptico invertido modelo Eclipse TE2000-E de la marca Nikon (figura 3). El microscopio óptico está equipado con una lámpara de tungsteno de luz blanca empleada para adquirir las imágenes ópticas, así como de una fuente LED (Diodo emisor de luz, del inglés *Light*

Emitting diode) con longitudes de onda de 480 nm (azul) y 365 nm (UV) empleadas para iluminar la muestra durante los estudios de fotodegradación. Para seleccionar la región de estudio de la muestra se ha empleado un objetivo de 10 aumentos mientras que para controlar el área de iluminación el objetivo utilizado ha sido de 40x, ambos Plan Fluor de Nikon. Las micrografías han sido tomadas en transmisión usando campo claro con una cámara réflex digital (Canon EOS 500D) acoplada a un puerto del microscopio óptico. Hay que destacar que este estudio de fotodegradación se ha podido realizar gracias a la posibilidad que ofrece el microscopio combinado de iluminar la muestra desde abajo, ya que si se ilumina desde arriba se produce un efecto de sombra de la micropalanca sobre la muestra, de manera que la zona a estudio, justo bajo la punta, no está sometida a la irradiación procedente de la fuente de luz.

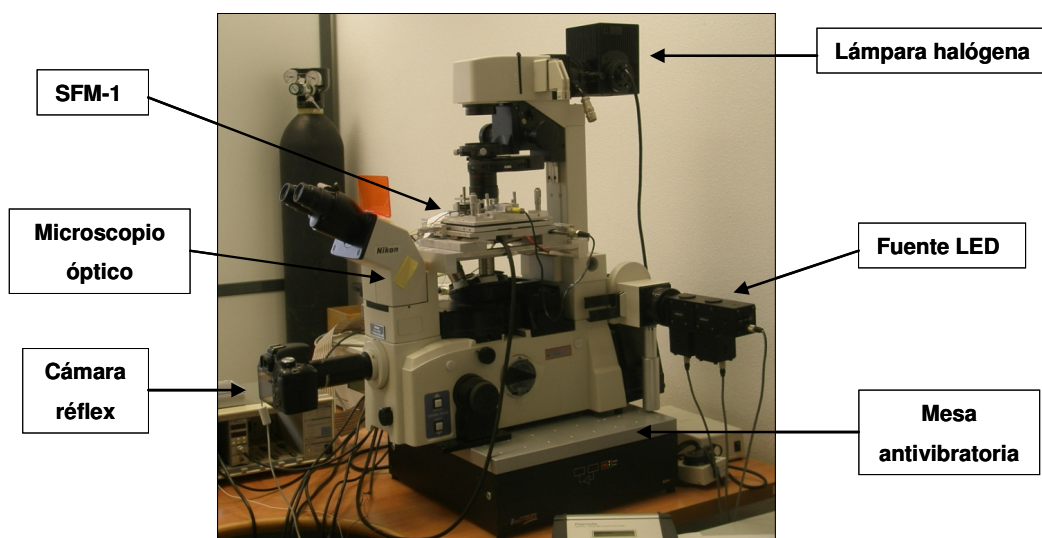


Figura 5.3. Fotografía del sistema combinado empleado en la realización del experimento. Las flechas indican los principales componentes que lo forman.

Siendo totalmente rigurosos, no es cierto que lo que definimos como medidas en oscuridad se realicen en condiciones de total oscuridad ya que el láser rojo (633 nm) del sistema de detección del SFM siempre está presente durante las medidas. Sin embargo, ya que la longitud de onda roja está lejos de la banda de absorción del P3OT, no se espera una gran influencia debido al láser rojo. De esta forma a partir de este momento, cuando hable de condiciones de “oscuridad” en nuestros experimentos, se estará haciendo referencia al caso en que no hay ninguna iluminación externa aplicada sobre la muestra y solo está presente el láser rojo del sistema de detección. En el caso en que el interés se centrara en el estudio de muestras que absorbieran en

el rojo, sería necesario cambiar la longitud de onda del láser empleado en el sistema de detección.

Para las medidas de potencial de contacto, la iluminación se ha realizado desde abajo. Con el objetivo de 40x el área iluminada de la muestra es aproximadamente de $250 \mu\text{m}^2$. Los valores de irradiación se han estimado calculando la irradiancia como la potencia del LED entre el área iluminada (Wcm^{-2}) y multiplicando por el tiempo de exposición en cada caso. No se ha realizado un estudio detallado de las pérdidas de intensidad en los componentes ópticos del microscopio (lentes, espejos, etc) de manera que los valores dados están ligeramente sobreestimados. Por esta razón los gráficos de potencial de contacto frente a irradiación se presentan en unidades arbitrarias (a.u. del inglés *arbitrary unit*). No obstante estimamos que 1 a.u. corresponde a 1kJcm^{-2} . El error cometido en la irradiación estimada es semejante para las diferentes longitudes de onda, de forma que se puede realizar una comparación relativa entre ellas.

Otro punto importante para el análisis correcto de las medidas de CP es que debido a que la adquisición de las imágenes de KPM es relativamente lenta (alrededor de 20 minutos por imagen) no se puede considerar una dosis homogénea de irradiación a lo largo de cada imagen, ya que al haber sido adquiridas de abajo hacia arriba, la parte inferior de la imagen ha sido irradiada menos que la superior. Por eso en los gráficos de potencial de contacto frente a irradiación que se mostrarán, se han representado los valores promedio de CP frente a los valores promedio de irradiación. Esta aproximación es correcta para obtener una visión general de lo que está ocurriendo aunque no hay que olvidar, que como se verá más adelante, existe un claro gradiente de CP en las imágenes de KPM.

5.3.3 Espectroscopía Raman

Los espectros Raman se han adquirido con un sistema Renisaw 1000 equipado con un detector CCD (dispositivo de carga acoplada del inglés *Charge-Coupled Device*) enfriado a -77°C . La excitación se ha realizado con un láser de Argón con una longitud de onda de 514 nm. Los datos se han obtenido promediando 5 espectros de 60 s cada uno, con una resolución espectral de 2cm^{-1} .

5.4. Resultados

5.4.1. Estudio de SFM y KPM

El objetivo de esta primera sección es estudiar las variaciones en el potencial de contacto inducidas por la iluminación externa, y de esta forma correlacionarlas con las propiedades electro-ópticas. Cuando se mide el potencial de contacto en función del tiempo, en principio pueden tener lugar diferentes efectos. Por un lado, incluso en condiciones de oscuridad, la muestra puede sufrir degradación debido a la exposición con el aire, lo que modificaría el potencial de contacto. Por otro lado, cuando se ilumina la muestra, la luz puede inducir variaciones reversibles o irreversibles en el CP. Para separar estos diferentes efectos, las imágenes se han adquirido primero en oscuridad durante varias horas, después con iluminación externa y finalmente en oscuridad de nuevo. Estas series de imágenes se han tomado con diferentes longitudes de onda de iluminación.

En primer lugar, se ha comprobado que cuando las imágenes de la muestra son adquiridas en oscuridad el potencial de contacto se mantiene constante durante la escala de tiempo de los experimentos (de horas a varios días) y tanto el color de la muestra como la topografía no se ven modificados. Así se puede asumir que para las condiciones experimentales de oscuridad (temperatura ambiente y humedad relativa del 40 al 60%) las muestras son estables. Por lo tanto cualquier cambio morfológico o en el potencial de contacto observado bajo iluminación, se puede atribuir a la irradiación externa.

Las figuras 4 (c) y (g) muestran imágenes de potencial de contacto en dos regiones que han sido irradiadas con longitudes de onda azul y ultravioleta respectivamente, con la misma energía de aproximadamente 40 kJcm^{-2} (10 Wcm^{-2} durante 66 min). Se puede ver, que en ambos casos la iluminación induce un cambio en el potencial de contacto, lo que indica que la estructura electrónica del polímero ha sufrido alguna modificación. Sin embargo, mientras que cuando se irradia con azul el CP se desplaza a valores menores, ($\Delta \text{CP}_{\text{blue}} = -230 \text{ mV}$) con respecto al potencial de contacto del P3OT en oscuridad, al irradiar con luz ultravioleta el potencial de contacto se desplaza hacia valores mayores ($\Delta \text{CP}_{\text{UV}} = + 80 \text{ mV}$). Esto significa que el potencial de contacto es sensible a la longitud de onda de la iluminación, no solo en valor absoluto, sino también en signo, lo que indica que los diferentes fenómenos foto-

inducidos dependen de la longitud de onda. Una vez apagada la luz (figura 4 (d) y (h)), el potencial de contacto no vuelve al valor inicial, si no que permanece, dentro del error experimental (10 mV), en el mismo valor del último estado iluminado.

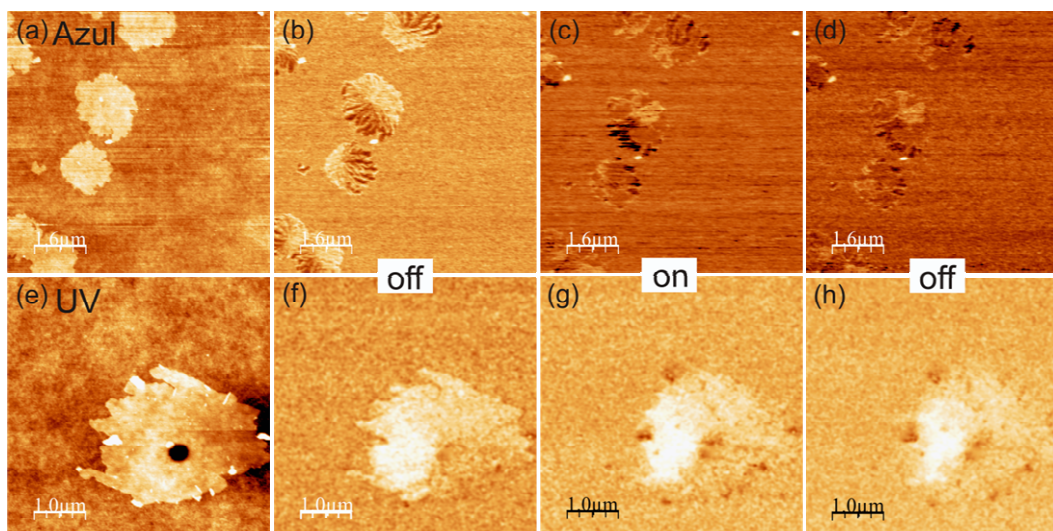


Figura 5.4. Las imágenes (a) y (e) corresponden a la topografía de la muestra. Las demás (b)-(d) y (f)-(h) corresponden a imágenes de potencial de contacto de dos regiones diferentes de la muestra iluminadas con diferente longitud de onda. La fila superior (a-d) corresponde a una región que se ilumina con luz azul, mientras que la fila inferior (e-h) corresponde a otra región iluminada con luz ultravioleta. Las imágenes de topografía (a) y (e) y las de potencial de contacto (b) y (f) corresponden al estado inicial de la muestra, por lo que estas imágenes han sido tomadas en oscuridad. En (c) y (g) se muestran las imágenes de potencial de contacto adquiridas iluminando la muestra con radiación azul (c) y ultravioleta (g) respectivamente. En (d) y (h) se muestran las imágenes de potencial de contacto en oscuridad, después de haber estado iluminada la muestra. La escala en z de las imágenes de topografía corresponde a 10 nm. Todas las imágenes del potencial de contacto se presentan como datos crudos o sin procesar, pero con la misma escala en z de 400 mV.

Durante la iluminación pueden tener lugar dos tipos diferentes de procesos que modifican el potencial de contacto. Por un lado, fenómenos foto-físicos que incluyen generación de “fotocarga”, separación de excitones, redistribución de carga, acumulación de carga en las interfases, etc. Estos procesos son reversibles y si la luz se apaga, el estado inicial en oscuridad se debería recuperar después de un periodo de tiempo transitorio necesario para que el sistema vuelva al estado de equilibrio. Por otro lado, las reacciones fotoquímicas inducen un cambio no reversible en el polímero, causándole una degradación que depende del tiempo y la intensidad de la iluminación. En este caso, cuando el polímero vuelve a la oscuridad, el valor del potencial de contacto permanece similar al del último estado iluminado ya que la naturaleza del polímero se ha visto modificada. En el caso general ambos tipos de fenómenos están

mezclados y el estado final de oscuridad estará en algún lugar entre ellos. De la discusión anterior podemos concluir que el cambio permanente en el potencial de contacto observado en la figura 5.4 se debe a la degradación del polímero, quedando enmascarada cualquier actividad foto-física.

A) Irradiación con azul ($\lambda=480$ nm).

Como ya se ha mencionado anteriormente, los procesos de degradación dependen de la intensidad de la luz y evolucionan con el tiempo de irradiación; esto es, dependen del número de fotones que llegan a la muestra. Por este motivo, para aclarar y comprender los efectos foto-inducidos que tienen lugar mientras el P3OT es irradiado con luz azul, se han adquirido imágenes de topografía y potencial de contacto a diferentes tiempos de exposición. Los resultados obtenidos cuando la muestra es irradiada con luz azul (480nm) se muestran en la figura 5.5.

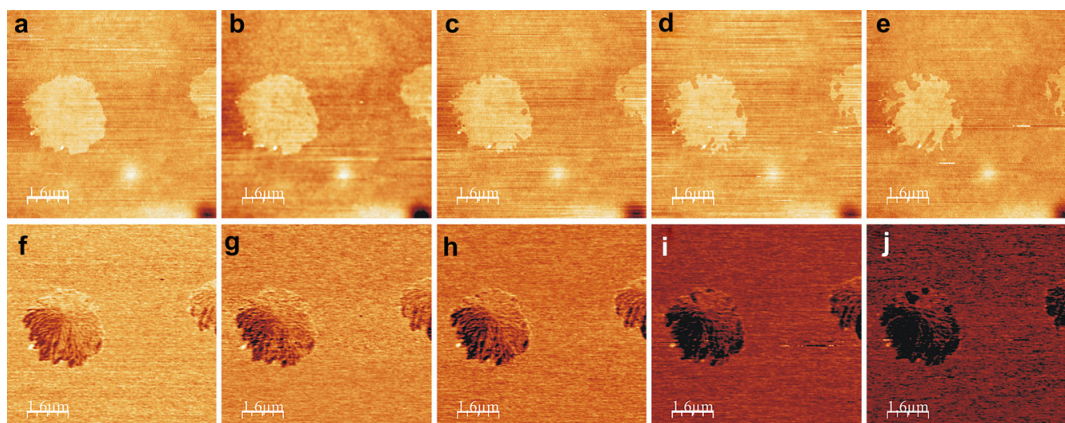


Figura 5.5. Imágenes de topografía (a)-(e) y KPM (f)-(j) adquiridas para diferentes dosis de irradiación con luz de longitud de onda de 480 nm. La escala en z es de 400 mV.

En las imágenes de topografía de la figura 5.5 se aprecia como las estructuras lamelares tienden a desaparecer, mientras que la morfología del polímero amorfo permanece prácticamente inalterado a esta escala. Por el contrario, el potencial de contacto del polímero amorfo decrece monótonamente con el tiempo de exposición hasta que se satura en un valor de potencial de contacto de -280mV aproximadamente. Este desplazamiento en el potencial de contacto se muestra cuantificado en la figura 5.6. Como se explica en el apartado 5.3.2, el valor medio del

potencial de contacto se calcula para cada imagen de KPM y se representa como una función del valor medio de irradiancia para cada imagen.

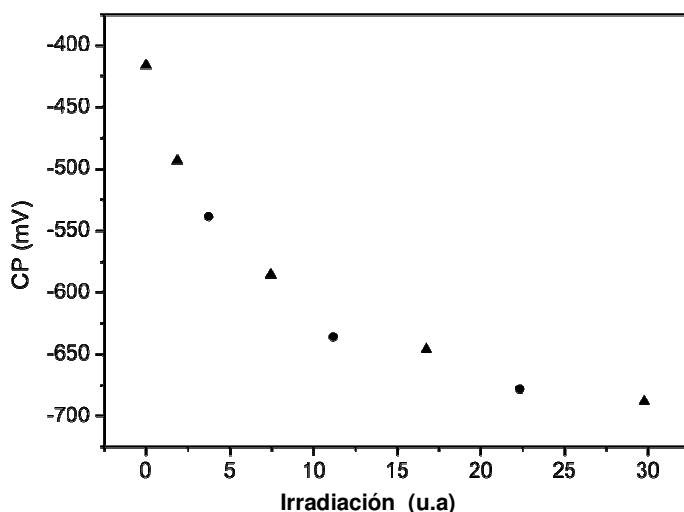


Figura 5.6. Gráfico en el que se representan las medidas de CP frente a irradiación, al iluminar la muestra con luz azul. Los puntos triangulares corresponden a los valores obtenidos a partir de las imágenes (f)-(j) de la figura 5, mientras que los puntos redondos corresponden a imágenes que no se muestran en esta figura. Como se explica en el apartado 5.3.2 las unidades arbitrarias de la irradiación equivalen a kJ cm^{-2} .

Experimentos similares se han repetido con diferentes intensidades de iluminación, dando esencialmente el mismo estado final aunque como es de esperar el tiempo total requerido para alcanzarlo es diferente. Por lo tanto, el valor final de saturación del potencial de contacto depende principalmente de la irradiación, tal como sería de esperar para un proceso de degradación.

En estudios previos se ha señalado que la irradiación de P3AT con luz visible y ultravioleta conduce a una disminución de la densidad óptica [Abdou95]. Como se puede apreciar en la micrografía óptica de bajo aumento (figura 5.7) este efecto también se encuentra en este estudio, donde se observa que en la región que ha permanecido iluminada el polímero se vuelve más transparente, perdiendo su característico color rojizo. Se puede correlacionar esta pérdida gradual de color con el cambio de potencial de contacto, confirmando que se produce degradación en el polímero. El recuadro de la figura 5.7 muestra una micrografía de alta magnificación de la región iluminada en azul donde se puede apreciar que la estructura microscópica de P3OT no se ha visto fuertemente modificada y el efecto principal es el blanqueamiento del polímero.

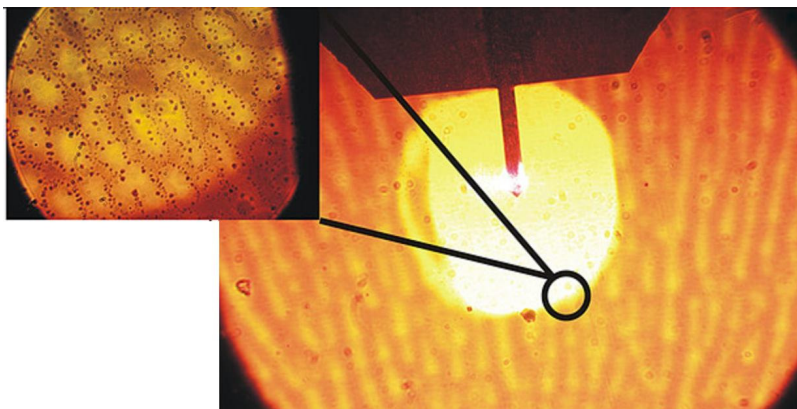


Figura 5.7. Micrografía de bajo aumento óptico donde se observa el fotoblanqueo de la región irradiada. El recuadro muestra una ampliación de la región fotodegradada. La micrografía óptica ha sido tomada justo después de la última medición del potencial de contacto y por lo tanto corresponde al estado final en el gráfico de la figura 5.6.

Para confirmar que el cambio fuerte de la densidad óptica y las propiedades electrónicas del polímero no se correlacionan con un cambio de la morfología en la escala nanométrica, la punta del SFM se sitúa en la interfase de la región degradada y no degradada (figura 5.8). A simple vista, la topografía de la película está dominada por la morfología ondulada de la superficie del polímero y no pueden distinguirse claramente las dos regiones excepto por que las estructuras lamelares están ligeramente dañados en la zona iluminada. Una inspección detallada de la imagen topográfica muestra que hay un pequeño escalón entre las dos regiones de unos 4 nm de altura, siendo ésta inferior en la zona degradada. Esto indica que ha teniendo lugar algún tipo de ataque no sólo en las estructuras lamelares sino también en el polímero amorfo. En la imagen de potencial de contacto ambas regiones se distinguen claramente debido a sus diferentes propiedades electrónicas.

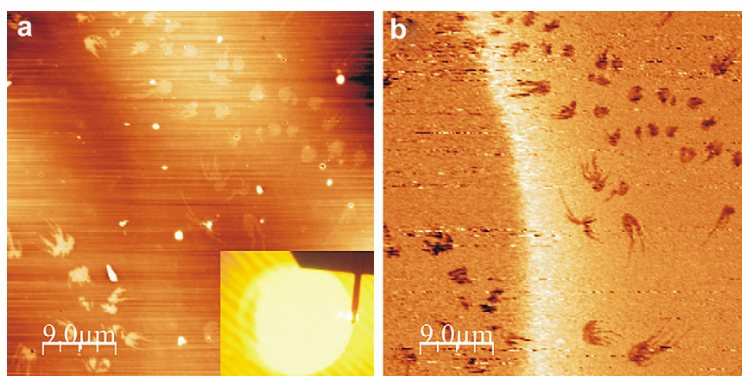


Figura 5.8. Imagen de topografía (a) e imagen de KPM (b) tomada en la interfase de las regiones no degradada y degradada tras iluminar. El recuadro de la imagen (a) corresponde a una micrografía óptica que muestra la punta del SFM situada en la interfase.

Aparte de la pequeña fotoablación que se ha discutido anteriormente, el fondo de polímero amorfo no sufre aparentemente modificaciones morfológicas considerables, siendo la degradación mucho más evidente en el cambio del potencial de contacto y de las propiedades ópticas. En cambio, como ya se mencionó anteriormente, la morfología de las estructuras lamelares sí se modifica durante la irradiación. La figura 5.9 muestra la evolución de la morfología y del potencial de contacto de las estructuras lamelares para tiempos crecientes de irradiación. La intensidad en esta serie es mucho menor que en los experimentos mostrados anteriormente. De esta forma el proceso de degradación se ve ralentizado y podemos captar los detalles que en degradaciones más rápidas pasarían desapercibidos.

En lo que concierne a la morfología podemos ver que, para tiempos pequeños o moderados de irradiación se forman agujeros que van creciendo en tamaño “comiéndose” la estructura lamelar hasta que desaparece y toda la superficie tiene la apariencia de polímero amorfo ($t = 676$ min). Curiosamente, la evolución del CP es completamente diferente. Inicialmente encontramos los dominios de potencial característicos en estas estructuras y a medida que las lamelas son atacadas y van desapareciendo, se mantiene la “mancha” de los dominios de potencial, que permanece incluso cuando en las imágenes de morfología la estructura ha desaparecido completamente. Para tiempos de irradiación intermedios (aproximadamente entre 676 y 1456 min), las “manchas” siguen evolucionando ligeramente mientras que la correspondiente topografía no evidencia estructuras asociadas a estas manchas. Sin embargo, en este punto hay que notar que en este rango de tiempos, las imágenes de topografía se vuelven más borrosas y las líneas aparecen estiradas. Esto no es debido a inestabilidades del microscopio o a variaciones de la temperatura, sino a cambios intrínsecos en la muestra (movimiento de las moléculas, cambios químicos, etc.) que modifican ligeramente la interacción punta-muestra. Por lo tanto, aunque no seamos capaces de apreciar los detalles, probablemente porque los cambios ocurren a una escala molecular fuera del rango de nuestra resolución, se puede concluir que el fondo de polímero amorfo también cambia, lo que concuerda con la fotoablación encontrada anteriormente.

“A priori”, se podría pensar que las “manchas” en el CP son huellas que dejan las estructuras lamelares. Sin embargo, si seguimos aumentando el tiempo de irradiación ($t > 1716$ min) vemos que en la topografía vuelven a aparecer las estructuras lamelares que estaban enterradas. A partir de este momento, el CP apenas cambia hasta que las estructuras lamelares desaparecen definitivamente y con

ellas el potencial de contacto asociado. Por lo tanto, podemos afirmar que lo que llamamos estructura lamelar y que inicialmente parece estar formada por una capa superficial de polímero cristalino en el que las moléculas se ordenan como se explicó anteriormente, es en realidad una estructura tridimensional compuesta por varias capas de polímero cristalino o semicristalino separadas por capas de polímero amorfo o semiamorfo. La luz azul se va comiendo el polímero poco a poco y va destapando las estructuras que hay debajo en una especie de tomografía.

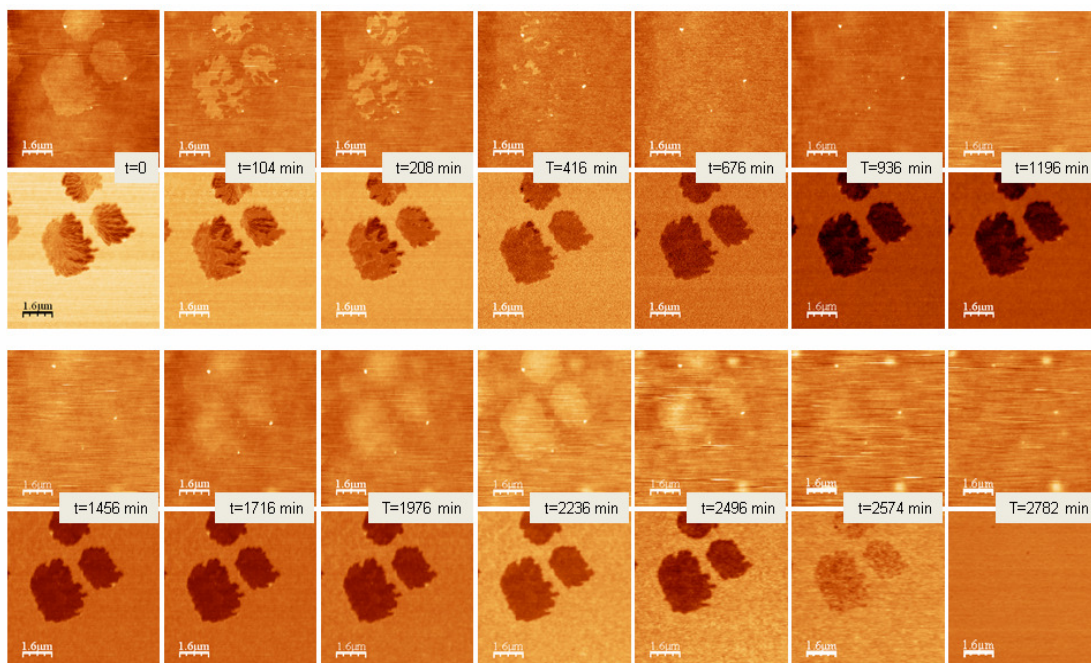


Figura 5.9. Imágenes de topografía (1ª y 3ª fila) y CP (2ª y 4ª fila) de una lámina delgada de P3OT adquiridas para diferentes dosis de irradiación con luz de longitud de onda de 480 nm. En esta secuencia se aprecia notablemente la evolución de las estructuras lamelares que inicialmente desaparecen en la topografía, mientras los valores de CP decrecen hasta alcanzar un valor de saturación. Posteriormente reaparecen las lamelas y aumenta el CP, hasta que finalmente desaparecen estas estructuras en las imágenes de topografía y CP.

B) Irradiación con UV

Para comparar la influencia que tiene la longitud de onda de la luz irradiada sobre la degradación, se llevó a cabo el mismo proceso descrito anteriormente para luz azul iluminando en este caso con radiación ultravioleta de 365 nm de longitud de onda. La figura 5.10 muestra la evolución de la topografía (a) - (e) y las imágenes de potencial de contacto (f) - (j) de P3OT para diferentes dosis de exposición ultravioleta. Con ésta longitud de onda las estructuras lamelares no se dañan y la topografía no

cambia significativamente, mientras que el potencial de contacto se desplaza ligeramente a valores más altos (figura 10 (k)). Para exposiciones de radiación similares a la del que se utilizan en la fotodegradación con luz azul, el cambio de potencial de contacto es de sólo 80 mV aproximadamente y no se encuentra un valor de saturación, probablemente porque la degradación no es completa. Esto se confirma con micrografías ópticas (figura 5.10 (l)), donde a pesar de que la disminución de la densidad óptica del polímero se hace visible, el contraste entre la región iluminada y no iluminada es considerablemente menor que la observada previamente con radiación azul (figura 5.7).

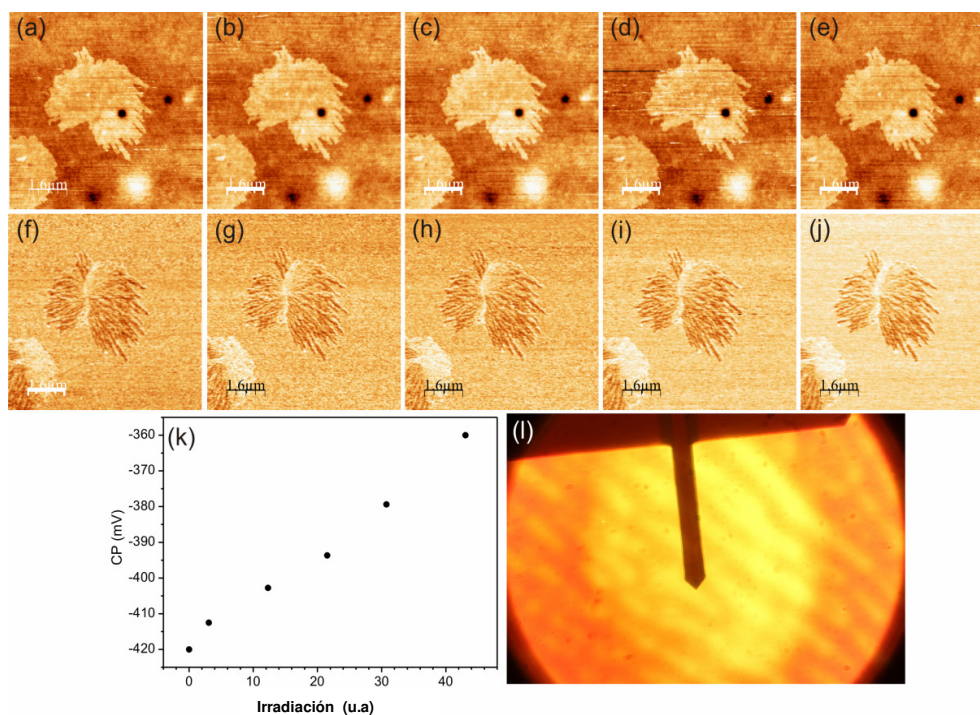


Figura 5.10. Imágenes de topografía (a)-(e) y de potencial de contacto (f)-(j) adquiridas para diferentes irradiaciones con luz de longitud de onda de 365 nm (escala en z de 400 mV aproximadamente). (k) Gráfico de potencial de contacto frente a irradiación. (l) Micrografía óptica de bajo aumento donde se puede distinguir el comienzo del fotoblanqueamiento del polímero en la región irradiada. La micrografía óptica ha sido tomada justo después de la última medición de potencial de contacto y por lo tanto corresponde al estado final de irradiación en el gráfico (k).

No solo es interesante comparar la evolución del potencial de contacto en función de la longitud de onda utilizada durante la iluminación sino que también es importante comparar como depende la eficacia de la degradación con la longitud de onda, es decir para una irradiancia similar. Si comparamos directamente las micrografías ópticas de las figuras 8 y 10 parece que, bajo una exposición similar de irradiación, la luz azul degrada la muestra significativamente más que la luz

ultravioleta. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este caso la irradiación hace referencia a la intensidad de la iluminación exterior y no a la cantidad de energía absorbida. La absorbancia del P3OT a 480 nm es aproximadamente tres veces mayor que a 365 nm [Sigma-aldrich] (figura 5.11), lo cual debe tenerse en cuenta para un estudio cuantitativo.

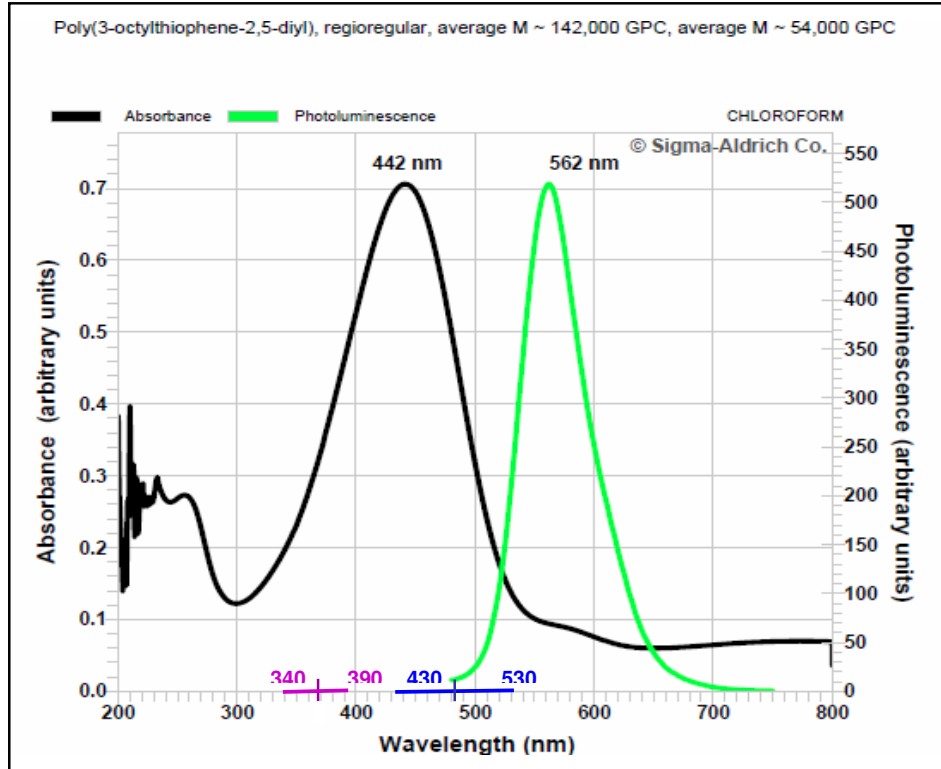


Figura 5.11. Espectro de absorción del P3OT (línea negra) en el que se aprecia que la absorción es mayor para la radiación azul que para la UV. En el eje de longitudes de onda se han incluido los rangos espectrales del LED UV (340 nm – 390 nm) y del LED azul (430 nm – 530) así como los máximos de emisión (365 nm y 480 nm, respectivamente). Imagen obtenida de la página www.sigmaaldrich.com.

Con el fin de comparar la degradación debida a la iluminación para las dos longitudes de onda, la velocidad en la variación del potencial de contacto se ha calculado a partir de los datos que se muestran en las figuras 5.6 y 5.10 (k): se obtiene una variación de la media de la pendiente del potencial de contacto frente a la dosis de radiación de aproximadamente $-30 \text{ mV kJ}^{-1} \text{ cm}^2$ para la luz azul y $1 \text{ mV kJ}^{-1} \text{ cm}^2$ para la luz ultravioleta. Teniendo en cuenta que la absorción es tres veces mayor para la radiación azul que para la ultravioleta, llegamos a la conclusión de que la degradación de la muestra, medida por la variación de potencial de contacto, es un orden de magnitud más grande cuando se emplea luz azul que cuando se ilumina con ultravioleta.

Ya que el potencial de contacto es una magnitud directamente relacionada con las propiedades electrónicas del material y con su composición química, se puede asumir que los cambios en el potencial de contacto indican una modificación en la naturaleza del material, de forma que se puede deducir de los resultados, que la incidencia sobre el polímero de fotones en el rango de radiación azul es mucho más agresiva que en el caso de los rayos ultravioleta.

5.4.2. Estudio de espectroscopía Raman

Para correlacionar el cambio del potencial de contacto y de color con los cambios químicos que se hayan podido producir, se han tomado espectros Raman en las regiones degradada y no degradada (figura 5,12), tanto para la muestra iluminada con azul como para la irradiada con ultravioleta. La región sin degradar (figura 5.12 (a)) muestra los picos característicos de P3OT correspondientes a las bandas de absorción más intensas que figuran en el Tabla 5.1 [Bazzaoui2001]. Los picos en el rango de frecuencias de 1000 a 1600 cm^{-1} corresponden a los modos normales de vibraciones del anillo de tiofeno. La posición exacta y la intensidad de estos picos dependen del grado de polimerización y la densidad de defectos, que a su vez determinan el grado de aromaticidad de la molécula [Furukawa87]. Los picos en el rango de frecuencias altas corresponden a los modos normales del C-H de las cadenas laterales alquilo.

Bandas (cm^{-1})	Modos Normales Asignados
717	ν_7 (C-S-C) ring bending
1011	C-R symmetry stretching
1089	ν_5 (C-H) bending
1188	C-H bending
1370	ν_3 (C-C) ring stretching
1443	ν_2^a (C=C) aromatic symmetry ring stretching
1507	ν_1 (C=C) antisymmetry ring stretching
2828	C-H stretching
2887	C-H stretching

Tabla 5.1. Longitudes de onda (primera columna) correspondientes a las bandas de absorción más relevantes del polímero (segunda columna).

Los espectros Raman obtenidos en regiones irradiadas en azul y ultravioleta se muestran en la figura 5.12 (b) y (c) respectivamente. A simple vista, se puede apreciar de forma cualitativa que los productos finales en ambos casos son muy diferentes. Por un lado, cuando se irradia la muestra con azul (figura 5.12 (b)) los picos asociados a las cadenas laterales alquilo permanecen esencialmente inalterados, mientras que los correspondientes al anillo de tiofeno casi desaparecen, lo que indica que ha tenido lugar una fuerte modificación en el polímero y el anillo tiofénico se ha dañado. Por otro lado, con la radiación ultravioleta, los cambios más relevantes tienen lugar para longitudes de onda asociadas al anillo de tiofeno donde hay un claro ensanchamiento de la banda y un cambio de la intensidad relativa de las bandas simétrica y antisimétrica con un desplazamiento de 60 cm^{-1} hacia frecuencias más altas que indica una localización del enlace π . Por otra parte, no se observa ninguna banda de absorción nueva en la región 1685 y 1710 cm^{-1} que normalmente se asocia a la existencia de grupos carbonilo, de manera que llegamos a la conclusión de que los grupos oxigenados no están presentes en la muestra.

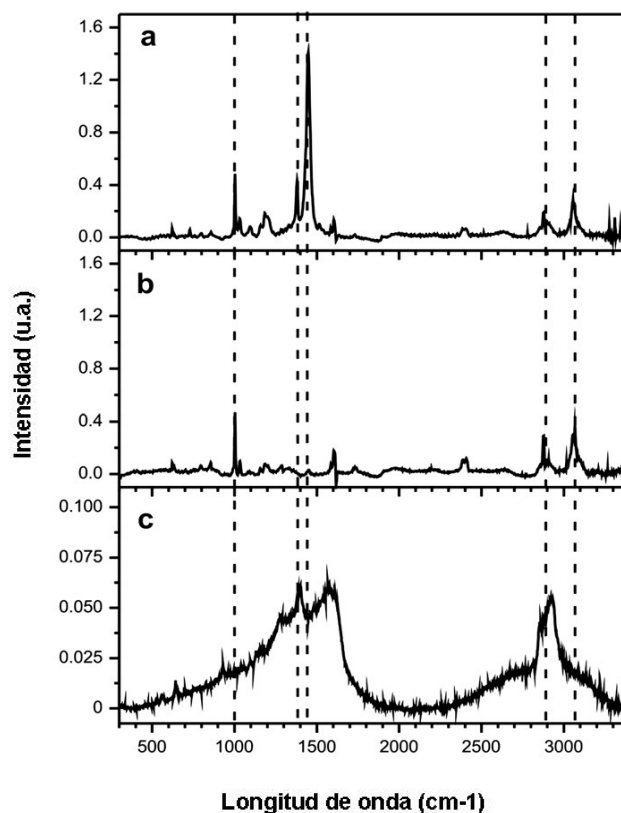


Figura 5.12. Espectros Raman de (a) la región no degradada, (b) región degradada después de haber sido iluminada con luz azul durante 80 minutos con una intensidad de 7 W cm^{-2} y (c) región degradada después de ser iluminada con luz ultravioleta durante 80 minutos con una intensidad de 13 W cm^{-2} .

Los resultados obtenidos con la espectroscopía Raman confirman que el mecanismo que domina la fotodegradación del P3OT depende de la longitud de onda de la radiación incidente. Cuando la muestra se ilumina con luz azul, los espectros Raman muestran un cambio en las moléculas de la columna o cadena principal del polímero donde tiene lugar la destrucción de los anillos tiofénicos, mientras que las cadenas alquilo laterales permanece casi inalterada. Esto significa que los productos finales de la fotodegradación producida por luz azul son completamente diferentes del P3OT original ya que desaparece el anillo de tiofeno que otorga al P3OT sus propiedades electro-ópticas.

Por otro lado, bajo irradiación ultravioleta, los resultados de Raman sugieren que la fotodegradación es debida a la introducción sucesiva de defectos estructurales y la escisión de las cadenas del polímero. En las primeras etapas de degradación, estos cambios estructurales no provocan grandes modificaciones en la naturaleza intrínseca del P3OT, y por lo tanto en su estructura electrónica, de forma que podría ser visto como un P3OT "defectuoso". Así, el ataque con luz ultravioleta es menos agresivo que el azul descrito anteriormente, y esta es la razón para la pequeña variación encontrada en el potencial de contacto para esta radiación. Estudios previos han demostrado que cuando se degradan películas delgadas de P3AT por radiación ultravioleta y visible, tienen lugar diferentes mecanismos de degradación: reticulación o lo que es lo mismo, formación de una red tridimensional por medio de enlaces entre átomos de distintas cadenas, fotoblanqueamiento y la rotura o escisión de las cadenas del polímero [Abdou95, Manceau2009]. Los mecanismos químicos propuestos para cada proceso individual se explican ampliamente en [Abdou95]. La reticulación se inicia por fotólisis del catalizador de metal residual y requiere menos energía que los otros dos fenómenos dando lugar a un producto insoluble. El fotoblanqueamiento implica fotosensibilización y la reacción con oxígeno singlete mientras que la escisión de la cadena sigue una ruta clásica de fotooxidación que involucra la participación de las cadenas laterales alquilo [Abdou957, Abdou95].

Los resultados reportados previamente con las medidas realizadas de potencial de contacto y Raman, junto con la disminución en la densidad óptica encontrada en las muestras, indican que bajo radiación azul, el fotoblanqueo es el proceso de degradación dominante, en que el oxígeno singlete reacciona con las unidades tienilo, disminuyendo la longitud del enlace π -conjugado y por lo tanto la densidad óptica para formar ya sea sulfines o trans-dicetonas. En contraste, bajo irradiación ultravioleta el proceso principal de degradación es la escisión de la cadena que se localiza en el

enlace π , disminuyendo la longitud de conjugación de la columna de la cadena de tiofeno.

Debido a las grandes exposiciones de irradiación empleadas en el presente experimento y el bajo rendimiento cuántico de los mecanismos de reticulación creemos que no es el mecanismo dominante en ninguno de los casos anteriores. Es importante destacar que las dosis de radiación empleadas son unas 10 a 100 veces mayores que los valores típicos de radiación solar. Por lo tanto, en este caso el proceso de degradación está acelerado en comparación con una célula solar en funcionamiento. De esta forma si en función de la intensidad de la iluminación durante las medidas realizadas, el P3OT dura de varias horas a un par de días hasta que está completamente degradado, esto significa que una célula solar hecha de P3OT tendría un tiempo de vida útil de días a meses, de acuerdo con lo que se encuentra normalmente en este tipo de dispositivos. Sin embargo, gracias a una encapsulación adecuada se puede aumentar este tiempo de vida ya que estos procesos no ocurren en ausencia de oxígeno.

5.5. Conclusiones

De los resultados discutidos en este capítulo se pueden extraer varias conclusiones. La primera es que bajo irradiación de luz, las propiedades electro-ópticas del P3OT se ven más afectadas que la morfología. Está comúnmente aceptado que la degradación y por tanto la vida útil de los foto-dispositivos basados en polímeros se correlaciona con cambios nanomorfológicos, ya que después de irradiar se encuentran modificaciones de topografía en la muestra y aparecen diferentes características tales como aglomerados o segregación de fases cuando el polímero se mezcla [Rasmusson96, Etedgui97].

Sin embargo, para las exposiciones de irradiación utilizadas en el presente estudio, el polímero se degrada desde un punto de vista electro-óptico, y por lo tanto, pierde toda utilidad para aplicaciones optoelectrónicas, antes de que se aprecien cambios sustanciales en la morfología aunque se haya visto reducido en 4nm el espesor total de la película de 100nm. Variaciones importantes en la topografía, similares a los descritos en la literatura, no se observan hasta emplear exposiciones de irradiación de uno a dos órdenes de magnitud mayores.

La segunda conclusión importante es que la fotodegradación es muy sensible a la longitud de onda de la radiación, siendo la luz azul más dañina que la ultravioleta. La primera modifica la naturaleza del polímero destruyendo el anillo de tiofeno mientras que la segunda sólo induce la escisión de la cadena. En ambos casos se encuentra una disminución de la densidad óptica después de una exposición suficientemente prolongada como cabría esperar, ya que los dos tipos de degradación tienen como consecuencia final la disminución de la longitud de conjugación y por lo tanto una localización de los enlaces de la molécula. Esto hace que el gap entre los orbitales HOMO y LUMO aumente y que el polímero pierda su carácter semiconductor y se convierta en un aislante. Desde el punto de vista de las propiedades ópticas la consecuencia es un corrimiento hacia el UV del borde de absorción lo que da lugar a un blanqueamiento del polímero. La diferencia entre la luz azul y la UV es que la primera al destruir el anillo tiofénico localiza instantáneamente los enlaces previamente deslocalizados. Por el contrario, al iluminar con UV la longitud de localización se va reduciendo de forma gradual a medida que se van generando defectos en las cadenas poliméricas.

Conviene resaltar que esto tiene importantes consecuencias en cuanto al rendimiento del dispositivo: mientras que el problema de la radiación ultravioleta, generalmente considerada como la más importante, en principio, puede resolverse utilizando filtros adecuados, la degradación por la luz azul es un problema mucho más difícil de solucionar, ya que esta es la luz en la que se basa el funcionamiento del dispositivo, es decir, estos son fundamentalmente los fotones que son convertidos en energía eléctrica. De los experimentos realizados se concluye que la degradación inducida por la luz azul podría estar íntimamente relacionada con la propia fotoexcitación y es por tanto difícil de evitar. No obstante, si se quiere emplear P3OT en la realización de dispositivos duraderos y por tanto competitivos se debe encontrar la manera de inhibir esta fotodegradación. Estos resultados podrían extenderse no sólo para el resto de la familia P3AT sino también para muchos otros polímeros conductores, ya que los procesos de degradación son muy similares.

Por último, recalcar el poder de combinar las técnicas de microscopía de fuerzas a escala nanométrica con la microscopía óptica tradicional. Aunque esta combinación está bastante generalizada en el campo de la Biología o en Ciencia de Materiales, la mayoría de los estudios se llevan a cabo, utilizando sólo técnicas de SFM o técnicas ópticas de campo cercano (SNOM – del inglés *Near Field Optical microscopy*). A pesar del gran potencial de ambas por separado, ha sido poco

investigada la combinación de iluminación óptica en la microescala (óptica tradicional), con la caracterización simultánea de las propiedades morfológicas y electrónicas en la nanoescala. Como se ha podido comprobar, este enfoque ofrece una alternativa útil para caracterizar los fenómenos electro-ópticos de los materiales foto activos en la nanoescala.

5.6. Referencias

- [Abad2008] Abad J, Perez-Garcia B, Urbina A, Colchero J, Palacios-Lidon E. Layered self-organized structures on poly(3-octylthiophene) thin films studied by scanning probe microscopy. *Eur Polym J* 2008; 44(8):2506e15.
- [Abdou93] Abdou MSA, Holdcroft S. Mechanisms of photodegradation of poly(3- alkylthiophenes) in solution. *Macromolecules* 1993;26(11):2954e62.
- [Abdou95] Abdou MSA, Holdcroft S. Solid-state photochemistry of pi-conjugated poly(3- alkylthiophenes). *Can J Chem* 1995; 73(11):1893e901.
- [Abdou97] Abdou MSA, Orfino FP, Son Y, Holdcroft S. Interaction of oxygen with conjugated polymers: charge transfer complex formation with poly(3-alkylthiophenes). *J Am Chem Soc* 1997; 119(19):4518e24.
- [Bazzaoui2001] Bazzaoui EA, Bazzaoui M, Aubard JS, Lomas JS, Felidj N, Levi G. Surface enhanced Raman scattering study of polyalkylthiophenes on gold electrodes and in silver colloids. *Synth Met* 2001; 123(2):229e309.
- [Brabec2001] Brabec CJ, Sarcifftci NS, Hummelen JC. Plastic solar cells. *Adv Funct Mater* 2001;11(1):15e26.
- [Budget Sensor] www.budgetsensors.com

- [Campbell2008] Campbell AR, Hodgkiss JM, Westenhoff S, Howard IA, Marsh RA, McNeill CR, et al. Low-temperature control of nanoscale morphology for high performance polymer photovoltaics. *Nano Lett* 2008;8(11):3942e7.
- [Chiesa2005] Chiesa M, Bürgi L, Kim JS, Friend RH, Sirringhaus H. Correlation between surface photovoltage and blend morphology in polyfluorene-based photodiodes. *Nano Lett* 2005; 5(4):559e63.
- [Chu2005] Chu CW, Li SH, Chen CW, Shrotriya V, Yang Y. High-performance organic thinfilm transistors with metal oxide/metal bilayer electrode. *Appl Phys Lett* 2005; 87(19):193508.
- [Cumpston95] Cumpston BH, Jensen KF. Photooxidation of polymers used in electroluminescent devices. *Synth Met* 1995;73(3):195e9.
- [Ettedgui97] Ettedgui E, Davis GT, Hu B, Karasz FE. Degradation of polymer-based light emitting diodes during operation. *Synth Met* 1997; 90(1):73e6
- [Flores2009] Flores SM, Toca-Herrera JL. The new future of scanning probe microscopy: combining atomic force microscopy with other surface-sensitive techniques, optical and microscopy fluorescence techniques. *Nanoscale* 2009; 1(1):40e9.
- [Furukawa87] Furukawa Y, Akimoto M, Harada I. Vibrational key bands and electrical conductivity of polythiophene. *Synth Met* 1987; 18(1):151e6.
- [Hintz2010] Hintz H, Egelhaaf HJ, Peisert H, Chasse T. Photo-oxidation and ozonization of poly(3-hexylthiophene) thin films as studied by UV/VIS and photoelectron spectroscopy. *Polym Degrad Stab* 2010; 95(5):818e25.
- [Holdcroft91] Holdcroft S. A photochemical study of poly(3-hexylthiophene). *Macromolecules* 1991;24(8):4834e8.

- [Horcas2007] Horcas I, Fernandez R, Gomez-Rodriguez JM, Colchero J, Gomez-Herrero J, Baro AM. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum* 2007; 78(1):013705.
- [Jorgensen2008] Jorgensen M, Norrman K, Krebs FC. Degradation and stability of polymer and organic solar cells. *Sol Energy Mater Sol Cells* 2008; 92(7):685.
- [Kabra2010] Kabra D, Lu LP, Song MH, Snaith HJ, Friend RH. Efficient single-Layer polymer light-emitting diodes. *Adv Mater* 2010;22(29):3194e8.
- [Lee2000] Lee I, Lee JW, Stubna A, Greenbaum E. Measurement of electrostatic potentials above oriented single photosynthetic reaction centers. *J Phys Chem B* 2000; 104(11):2439e43.
- [Ljungqvist95] Ljungqvist N, Hjertberg T. Oxidative-degradation of poly(3-octylthiophene). *Macromolecules* 1995; 28(18):5993e9.
- [Manceau2008] Manceau M, Rivaton A, Gardette JL. Involvement of singlet oxygen in the solid-state photochemistry of P3HT. *Macromolecules Rap Com* 2008; 29(22): 1823e7.
- [Manceau2009] Manceau M, Rivaton A, Gardette JL, Guillerez S, Lemaitre N. The mechanism of photo- and thermooxidation of poly(3-hexylthiophene) (P3HT) reconsidered. *Polym Degrad Stab* 2009; 94(6):898e907.
- [Manceau2010] Manceau M, Chambon S, Rivaton A, Gardette JL, Guillerez S, Lemaitre N. Effects of long-term UV-visible light irradiation in the absence of oxygen on P3HT and P3HT: PCBM blend. *Sol Energy Mater Sol Cells* 2010; 94(10):1572e7.
- [Mohammad97] Mohammad F, Nalwa HS, editors. *Handbook of organic molecules and polymers*, vol. 3. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd; 1997. Ch. 16.

- [Nanotec] www.nanotec.es
- [Nonnenmacher91] Nonnenmacher M, O'Boyle MP, Wickramasinghe HK. Kelvin probe force microscopy. *Appl Phys Lett* 1991; 58(25):2921e3.
- [Palacios-Lidón2006] Palacios-Lidón E, Pérez-García B, Abellán J, Miguel C, Urbina A, Colchero J. Nanoscale characterization of the morphology and electrostatic properties of poly(3-octylthiophene)/graphite-nanoparticle blends. *Adv Funct Mater* 2006; 16(15):1975e84.
- [Palacios-Lidón2009] Palacios-Lidón E, Pérez-García B, Colchero J. Enhancing dynamic scanning force microscopy in air: as close as possible. *Nanotechnology* 2009; 20(8): 085707.
- [Palermo2007] Palermo V, Liscio A, Palma M, Surin M, Lazzaroni R, Samori P. Exploring nanoscale electrical and electronic properties of organic and polymeric functional materials by atomic force microscopy based approaches. *Chem Commun* 2007;32:3326e37.
- [Perez-Garcia2008] Perez-Garcia B, Abad J, Urbina A, Colchero J, Palacios-Lidon E. Surface potential domains on lamellar P3OT structures. *Nanotechnology* 2008; 19(6):065709.
- [Prosa92] Prosa TJ, Winokur MJ, Moulton J, Smith P, Heeger AJ. X-ray structural studies of poly(3-alkylthiophenes) - an example of an inverse comb. *Macromolecules* 1992; 25(17):4364e72.
- [Rasmusson96] Rasmusson JR, Brtims P, Birgersson J, Erlandsson R, Salaneck WR. The interface surfaces of a CN-substituted poly(phenylenevinylene) light-emitting diode, a morphological study. *Synth Met* 1996; 79(1):75e84.
- [Roncali92] Roncali J. Conjugated poly(thiophenes) - synthesis, functionalization, and applications. *Chem Rev* 1992; 92(4):711e38.

- [Schopf97] Schopf G, Kolbmehl G, editors. Polythiophenes – electrically conductive polymers. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag; 1997.
- [Sigma-aldrich] <http://www.sigmaaldrich.com>
- [Weaver91] Weaver JMR, Abraham DW. High-resolution atomic force microscopy potentiometry. J Vac Sci Technol B 1991; 9(3):1559e61.
- [Zimmermann2009] Zimmermann B, Wurfel U, Niggemann M. Longterm. Stability of efficient inverted P3HT: PCBM solar cells. Sol Energy Mater Sol Cells 2009;93(4): 491e6.

Conclusiones

En este trabajo se ha desarrollado un microscopio de fuerzas especialmente diseñado para que sea combinado de la mejor forma posible con técnicas ópticas. Además en el marco de esta tesis se ha aplicado este sistema combinado al campo de la Biología y la Ciencia de Materiales.

Como punto de partida se han establecido los criterios seguidos para construir nuestro microscopio “real” lo más cercano a uno “ideal”. Conforme a éstos criterios se han elegido los componentes adecuados y se ha realizado el diseño de un primer prototipo (SFM-1) que nos ha permitido comprobar el correcto funcionamiento del planteamiento general del diseño concreto así como de los componentes utilizados.

Posteriormente se ha trabajado en introducir una serie de mejoras en un segundo prototipo (SFM-2) que lo convierten en un equipo más completo, versátil y fácil de manejar. Las mejoras incorporadas son las siguientes:

- Un sistema piezoeléctrico xy más ligero (con menor frecuencia de resonancia) y con un mayor hueco interior lo que permite hacer medidas en una placa Petri.
- Un sistema piezoeléctrico de amplio barrido en xy ($200 \times 200 \mu\text{m}^2$).
- Un sistema de barrido z desacoplado del xy que actúa sobre la punta del SFM permitiendo adquirir imágenes a mayor velocidad.
- Una mesa xy que permite el desplazamiento motorizado de la muestra respecto a la punta para cambiar de zona.
- La colocación de la muestra se realiza por debajo del SFM sin tener que mover otros componentes.
- Un sistema de guías en z más robusto y estable.
- El acercamiento punta-muestra motorizado.
- La incorporación de un microscopio óptico en la parte superior para medidas en reflexión de muestras opacas.

- Un láser del sistema de detección de 685 nm que permite realizar medidas simultáneas de fluorescencia en el rojo.
- Un sistema de temperatura variable por medio de un módulo Peltier con un orificio central y una diferencia de temperatura máxima de 74°C.

Los dos microscopios que se han desarrollado cumplen con los mismos requisitos de estabilidad y rigidez que cualquier microscopio de fuerzas convencional de manera que permite obtener una resolución lateral de nanómetros y una resolución vertical sub-nanométrica. Además satisfacen unos criterios específicos derivados de la combinación con un microscopio óptico para que el SFM afecte lo menos posible al correcto funcionamiento de éste, de forma que ningún componente del SFM interfiera en su camino óptico y así el microscopio invertido mantenga las aperturas numéricas y las distancias de trabajo de los componentes ópticos, tanto en transmisión como en epi-fluorescencia.

Se han adquirido imágenes con ambos microscopios en diferentes modos de medida del SFM combinadas con diversas técnicas de microscopía óptica. En particular, el microscopio permite la adquisición de imágenes en los modos de contacto, modos dinámicos (AM-DSFM y FM-DSFM) así como el modo “Jumping” (JM-SFM). El buen funcionamiento en este último modo es destacable, ya que requiere de un sistema mecánico rígido y con una frecuencia de resonancia alta, un reto importante para un microscopio de tamaño grande, comparado con otro tipo de microscopios SFM.

Ambos equipos incorporan microscopía electrostática (ESFM) y Kelvin (KPM), lo que ha permitido que durante el desarrollo del SFM-2, el SFM-1 se haya aplicado al estudio de los fenómenos fotoinducidos en polímeros conductores empleando microscopía Kelvin combinada con microscopía óptica. En el estudio realizado sobre láminas delgadas de P3OT mostrado en el capítulo 5, se ha podido comprobar que bajo irradiación de luz el polímero se degrada y sus propiedades electro-ópticas se ven más afectadas, dando lugar a la pérdida de utilidad para aplicaciones optoelectrónicas. Además la fotodegradación es muy sensible a la longitud de onda de la radiación. La luz azul modifica la naturaleza del polímero destruyendo el anillo de tiofeno mientras que la radiación ultravioleta sólo induce la escisión de la cadena, aunque en ambos casos se encuentra una disminución de la densidad óptica después de una exposición suficientemente prolongada.

La caracterización de los fenómenos electro-ópticos de los materiales foto-activos en la nanoescala, supone un ejemplo del amplio potencial que ofrece la combinación de microscopía de fuerzas a escala nanométrica con la microscopía óptica tradicional.

Mejoras en curso y retos futuros

Desde que se iniciara el desarrollo del SFM descrito en este trabajo, los cambios en el diseño y las mejoras incorporadas han sido continuos. El SFM desarrollado a lo largo de esta tesis no es un equipo estático, sino que ha estado en permanente desarrollo para dar solución a la mayor cantidad posible de requerimientos técnicos que permitiesen la realización de nuevos experimentos. Por tanto, este no es un equipo que esté acabado sino que continúa creciendo y evolucionando.

Las siguientes son algunas de las mejoras técnicas en las que ya se está trabajando para incorporarlas al microscopio:

- Linearizar los sistemas piezoeléctricos tanto en xy como en z .
- Realizar la detección del SFM a través del objetivo que se encuentra situado en la parte superior. Este sistema además de aumentar la apertura numérica de la iluminación (el objetivo correspondiente constituiría un condensador de mayor apertura numérica) debería también mejorar la detección de la deflexión de la micropalanca y permitir una mayor focalización del haz sobre el fleje, para su uso en biolevers de menor tamaño y mayor frecuencia de resonancia, comparado con los flejes habituales.
- Excitar la resonancia de la micropalanca térmicamente por medio de un haz pulsado. De esta manera se espera tener un pico de resonancia limpio que mejore las medidas dinámicas, al mismo tiempo que permite prescindir del piezoeléctrico que excita actualmente la micropalanca de forma mecánica, así como del cableado que requiere.

- Acoplar el SFM a un microscopio óptico TIRF y confocal que se está desarrollando actualmente en el laboratorio. Esto permitirá alcanzar mayor resolución óptica y por tanto realizar experimentos combinados de moléculas individuales. Para las medidas con el sistema confocal se utilizará el barrido que realiza el SFM para obtener simultáneamente la imagen de campo cercano y la imagen óptica de microscopía confocal.
- Acoplar un sistema Raman y “Tip Enhanced Raman Scattering” (TERS) para poder realizar los estudios con ésta técnica “in situ”. Además, se pretende acoplar técnicas de espectroscopía infraroja.

En cuanto a las medidas y experimentos que se pretenden realizar en un futuro próximo destacan:

- El sistema de temperatura variable nos permitirá realizar medidas combinadas de SFM y fluorescencia de células vivas.
- Estudio del proceso de infección de un virus a una célula. Por un lado con fluorescencia se puede hacer el seguimiento del virus durante el proceso y con el SFM se pueden estudiar los cambios en las propiedades mecánicas de la célula.

Publicaciones

Escasain, E.; Lopez-Elvira, E.; Baro, A. M.; Colchero, J.; Palacios-Lidón E. Study of the light induced phenomena combining optical and KPM techniques. (Enviado).

Escasain, E.; Lopez-Elvira, E.; Baro, A. M.; Colchero, J.; Palacios-Lidón, E. Nanoscale Electro-Optical Properties of Organic Semiconducting Thin Films: From Individual Materials to the Blend. *Journal of Physical Chemistry C* 116 (33) 17919 (2012)

Escasain, E.; Lopez-Elvira, E.; Baro, A. M.; Colchero, J.; Palacios-Lidón E. Nanoscale surface photovoltage of organic semiconductors with two pass Kelvin probe microscopy. *Nanotechnology* 22 (37) 375704 (2011)

Lopez-Elvira, E.; Garcia-Perez, B.; Colchero, J.; Palacios-Lidón E. Surface characterization of P3OT thin films by variable temperature scanning force microscopy. *Synthetic Metals* 161 (15-16) 1651 (2011).

Lopez-Elvira, E.; Escasain, E.; Baro, A.; Colchero, J.; Palacios-Lidón E. Wavelength dependence of nanoscale photodegradation in poly(3-octylthiophene) thin films. *Polymer degradation and stability* 96 (7) 1279 (2011)

Manso-Silvan, M.; Rodriguez-Navas, C.; Hernandez, M. Arroyo; Lopez-Elvira, E.; Gago, R.; Vazquez, L.; Agullo-Rueda, F.; Climent, A.; Martinez-Duart, J. M.; Garcia-Ruiz, J. P. Hybrid titania-aminosilane platforms evaluated with human mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical materials research part B-applied biomaterials* 83B (1) 232 (2007).

Arroyo-Hernandez, M.; Manso-Silvan, Miguel; Lopez-Elvira, E.; Munoz, A.; Climent, A.; Martinez Duart, J. M. One step processing of aminofunctionalized gate oxides. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (12) 2786 (2007).

Abreviaturas

AN	Apertura numérica
AM-DSFM	Modo dinámico de microscopía de fuerzas en modulación de amplitud.
CCD	Dispositivo de cargas acopladas.
CP	Potencial de contacto
DIC	Microscopía de contraste de interferencia diferencial.
Dil	1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato
ESFM	Microscopía electrostática de campo cercano
FM-DSFM	Modo dinámico de microscopía de fuerzas en modulación de frecuencia.
FRET	Fluorescencia por transferencia de energía de resonancia.
FZ	Fuerza-distancia
GFP	Proteína verde fluorescente
ITO-PET	Óxido de indio y estaño sobre tereftalato de polietileno.
JM-SFM	Modo de salto o "Jumping".
KPM	Microscopía Kelvin de campo cercano.
LED	Diodo emisor de luz.
MFM	Microscopía magnética de campo cercano.
MO	Microscopio óptico.
P3OT	Poli-3(octiltiofeno).
SEM	Microscopía electrónica de barrido.
SIM	Microscopía de iluminación estructurada.
SNOM	Microscopía óptica de campo cercano.
STED	Microscopía del agotamiento de la emisión estimulada
TEM	Microscopía electrónica de transmisión.
TERS	Dispersión Raman mejorada por sonda.
TIRF	Fluorescencia de reflexión total interna.

Agradecimientos

La primera vez que me reuní con Jaime y Arturo consiguieron en tan solo una hora contagiarme no sólo la ilusión por el proyecto, sino por todo el trabajo científico que realizan. Tanto fue así que en ese mismo momento acepté embarcarme con ellos en esta aventura, incluso sabiendo que tendría que cambiar mi residencia, ya que una parte de la tesis se realizaría en la Universidad de Murcia y la otra en el Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid. En aquel momento no sabía todo lo que supondría aquella decisión. Pero ahora sin duda sé que fue una decisión acertada, ya que ha sido un auténtico privilegio trabajar con ellos. Muchas gracias a los dos por vuestra ayuda, por compartir conmigo todo lo que sabéis y por confiar en mí para este proyecto. En especial a Jaime por sus conocimientos, sus ideas, su entusiasmo y su vitalidad. A Arturo por su experiencia, su curiosidad y sus ganas de descubrir.

A los siguientes proyectos por la financiación durante estos años: Espectroscopía de Fuerzas y Fluorescencia en Biomoléculas Individuales (NAN2004-09183-C10-01) del Ministerio de Educación y Ciencia, Integración de un Microscopio de Fuerzas Atómicas AFM en un Microscopio Óptico de Alta Resolución (PET2007_0305) del Ministerio de Ciencia e Innovación, NanoObjetos: Desde átomos hasta Virus (S-2009/MAT-1467) de la Comunidad de Madrid y Force for Future del Programa Consolider- Ingenio 2010 (CSD2010-00024) del Ministerio de Economía y competitividad (MINECO).

De mi primera etapa en la Universidad de Murcia: A mis compañeros de laboratorio en Murcia, que bien lo he pasado con todos, nunca los días fueron tan cortos. A Eli por enseñarme de AFM especialmente lo que no está en los libros, por su buen criterio, su eficiencia, su inteligencia, su implicación, por acogerme en su casa y por ser tan buena amiga. A Bea por enseñarme a medir, por estar a mi lado desde los comienzos, por compartir experimentos, casa, experiencias y hasta “multiaventuras”. A Jose por todos los buenos ratos y por abrirme las puertas en su casa durante las estancias. A mis compañeros de despacho Sonia y Manolo y al resto de miembros del departamento Javier, Miguel, Andrés, Rafa, Adela... A todos ellos por los buenos momentos que pasamos en los cafés, en el despacho, en el laboratorio y en las celebraciones. Y también, aunque no hemos compartido laboratorio a Elisa E. por su trabajo con el primer prototipo y a Juanfran por su disponibilidad para ayudar y como no, por sus cálculos con el “Mathemática”.

De mi etapa en el ICMM: A Javier por enseñarme AFM el líquidos y mucho más. Por ser tan buena persona, por sus consejos y por su ayuda. A Pablo y Merche por compartir ciencia y experiencias en la sobremesa y venir a ayudarme al labo cuando se lo he pedido. A Jannette por su trabajo con el microscopio TIRF y confocal. A Lisa por ser tan buena compañera no solo en el labo. Por estar siempre dispuesta a ayudar, por tu capacidad de trabajo y aprendizaje y por no perder nunca la sonrisa. A Eloy por su capacidad de adaptación y su buen hacer. Y a Julio y Santiago del C-3 en la UAM por su disponibilidad y ayuda en todo lo que les pedimos.

A todo el equipo de Nanotec por su profesionalidad y por estar siempre disponibles. De manera más especial a Pablo por enseñarme en los comienzos, no solo AFM sino también el programa de diseño y estar siempre para todo lo que necesito. A Luis por todo el trabajo con la electrónica, todas las mejoras, el mano a mano en el laboratorio y por está siempre dispuesto a ayudar sobre cualquier tema. A Nacho y Alejandro por los desarrollos de software que son rápidos y eficientes. A Adriana por su implicación, apoyo y comprensión.

A Jose Luis y Pablo del SEGAINVEX en la Universidad Autónoma de Madrid y a Juan y Juanfran del SIDI de la Universidad de Murcia por el estupendo mecanizado de las piezas, su profesionalidad y rapidez. También a José, Miguel y Javier del taller del ICMM por las piezas y arreglos que nos hacen.

A Leo por su buen carácter y ser tan buena amiga durante tantos años. A Diana por su arrojo y por ser un gran apoyo y una estupenda compañera durante la carrera. A María por su capacidad de trabajo y por la ayuda en los comienzos en la investigación. Gracias a todas por las risas que hemos compartido.

Y finalmente, a los que me aguantan día a día, me dan fuerzas y animo, al motor de mi vida personal y los principales responsables de que sea como soy. A todos ellos por su calidad humana ¡Que suerte he tenido con la familia que me ha tocado! A mis padres por formarme como persona y permitirme formarme también profesionalmente, por confiar en mí y darme libertad e independencia. A mi madre, por ser un referente para mí, por su inteligencia, su sentido común (que como siempre dice, es el menos común de los sentidos), por sus buenos consejos y por enseñarme los valores de la honradez y la sinceridad. A mi padre por su perseverancia, y su sentido del humor. A mis hermanos Silvia y Víctor por estar siempre ahí, por compartir

la vida con ellos, alegrías y tristezas durante todo el camino. A mi abuela por ser un ejemplo tan admirable de profesionalidad y dedicación familiar, por ser autodidacta, por su capacidad de sorprenderse y su gran humor. A mi tío Julio por escuchar siempre y por darme tranquilidad y respuesta a algunas preguntas cuando lo necesito.

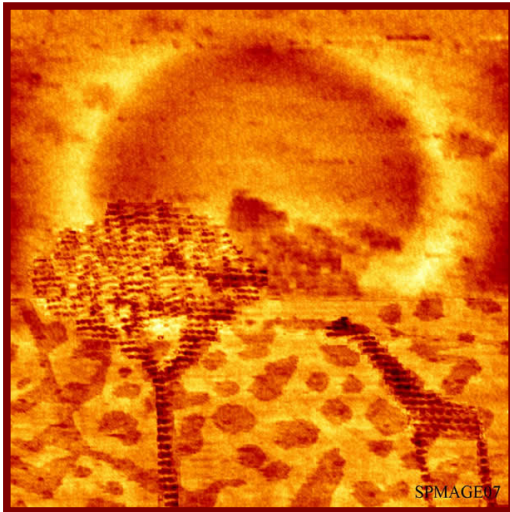
Y como no, a mi estupenda y “nueva” familia. A Jesús por ser mi compañero de viaje, por su ayuda, su cariño, simpatía, paciencia e inteligencia. A mi pequeño “Sol” Elia, por ser un encanto e iluminar mi vida día a día. Y aunque aún no está con nosotros, a mi pequeña futura princesita por impulsar con su próxima llegada la finalización de esta tesis.

He conocido personas estupendas, he aprendido muchísimo y he disfrutado en el camino ¿Qué más se puede pedir? Han sido unos años estupendos. Trabajar y vivir con vosotros ha sido un placer y un honor... ¡Muchas gracias a todos!

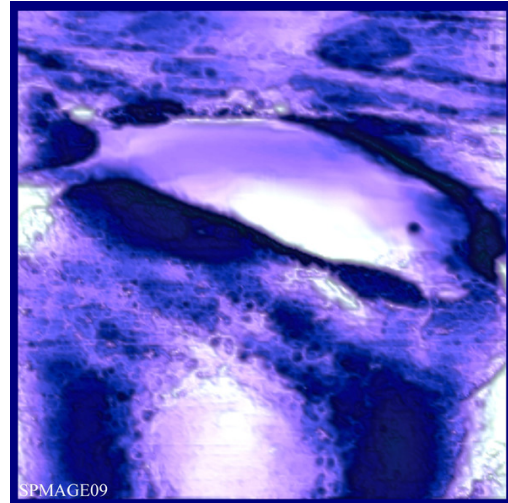
Galería de “nanoarte”

Y para finalizar un poco de arte en el “nanomundo”.

"Sunset in RNA Savannah"



"Dolphin under the moonlight"



Estas imágenes pertenecen a la galería de las exposiciones “Un vistazo al Nanomundo” de las ediciones del concurso SPMAGE07 y SPMAGE09 respectivamente. Ambas fueron seleccionadas entre las cincuenta finalistas.

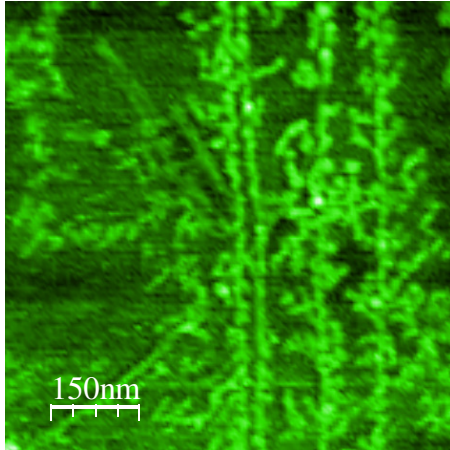
“Atardecer en la Sabana de RNA” está formada por la combinación de dos imágenes de litografía sobre silicio y una muestra de RNA. La imagen se llevó a cabo en la Universidad de Murcia.

“Delfín a la luz de la luna” es una muestra de fibroblastos marcados con GFP, fijados con glutaraldehído y depositados sobre vidrio. La imagen se adquirió con el SFM-1 en el Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid.

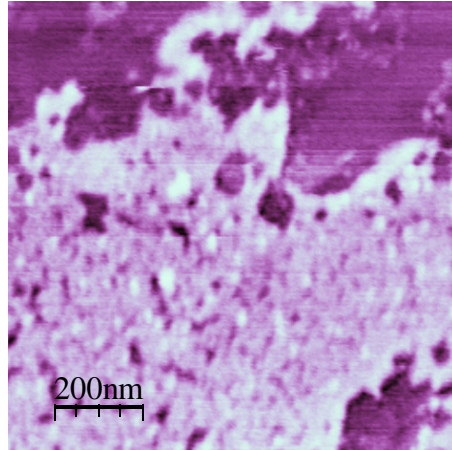
Por último unas imágenes de avidina sobre grafito... que con un toque de color y dejando volar un poco la imaginación encontramos: “El árbol de la avidina”, “La avidina fantasma”, “La avidina dragón” y “El código secreto de la avidina”.

Las mil caras de la avidina

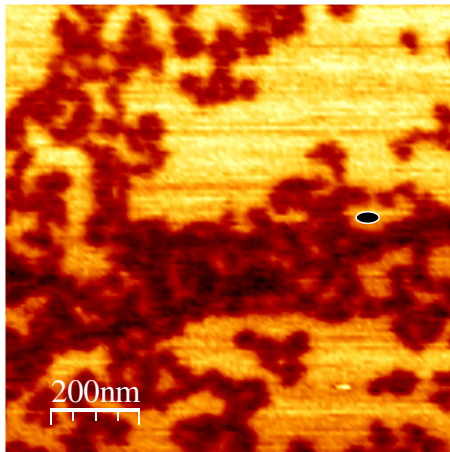
Avidin Tree



Avidin Phantom



Avidin Dragon



Avidin Secret Code

