

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
ISTITUTO DI FISICA APPLICATA “NELLO CARRARA”

**Generazione di fenomeni non lineari di terzo ordine in
microrisonatori ottici ibridi.**

“Short Term Mobility” 2014

Dr. Silvia Soria Huguet

30 Luglio 2014

1. Introduzione.

Questo progetto di ricerca interdisciplinare propone l'uso di microcavità ottiche o risonatori a modi di galleria (*whispering gallery modes*, WGM) come immunosensori con tecniche di rivelazione non lineari. Questo tipo di trasduttori hanno una elevata sensibilità (si possono rilevare delle molecole in soluzioni con concentrazioni attomolari), volumi dei campioni piccoli, ma, invece, hanno un'elevata densità di integrazione. I metodi usati per rilevare le biomolecole di interesse possono essere diretti (cambio dell'indice di rifrazione) oppure luminescenti (uso di marcatori fluorescenti). Le biomolecole invece possono essere grandi (sia come peso molecolare sia come dimensioni) come proteine e batteri, o molto piccole come gli anticorpi ed i virus.

Il principale obiettivo di questo progetto è la **generazione di fenomeni non lineari di terzo ordine in microrisonatori ottici ibridi**, tra questi fenomeni verranno studiati in particolar modo la fluorescenza a due fotoni e la generazione di nuove frequenze. Processi non lineari di terzo ordine potranno essere ottenuti per effetto dello straordinario confinamento spaziale della radiazione e dei lunghi tempi di vita della cavità. L'obiettivo è generare fluorescenza a due fotoni e generazione di armonici nel materiale organico legato covalentemente sulla superficie dei risonatori a modi di galleria (RWGM: risonatori whispering gallery mode).

I risonatori WGM (RWGM) che si propongono hanno geometria sferica, un elevato fattore di qualità Q (10^9) ed un volume modale effettivo elevato. Una conseguenza di queste proprietà è una maggiore densità di energia all'interno della microsfera: la luce si propaga lungo l'equatore della sfera grazie alla riflessione totale interna. La combinazione simultanea della forte localizzazione del campo elettromagnetico e la presenza di un campo evanescente implica un'enorme potenzialità delle microsfero come sensori. Il campo evanescente è presente nella superficie dei RWGM e quando le biomolecole d'interesse si legano alla superficie dei RWGM, si modificano le caratteristiche della risonanza, cioè, la risonanza si sposta in lunghezza di onda verso il rosso ed il fattore di qualità peggiora. Nei RWGM l'interazione tra l'analita da rilevare e la luce non dipende dalle dimensioni del risonatore come nel caso delle guide d'onda, ma dipende dal numero di rivoluzioni della luce all'interno della microcavità, cioè dal fattore di qualità Q .

Una microsfera di silice con un $Q = 10^8$ ha una lunghezza di interazione di quasi 16 m, quindi un RWGM con un diametro standard (200 μm) ha una capacità di rilevazione uguale o superiore ad una guida di onda, però con una superficie inferiore a questa ultima; di conseguenza, la quantità del campione ad analizzare è molto inferiore a quella della guida.

L'elevato fattore di qualità delle microsfero fa sì che il campo evanescente alla superficie aumenti in modo tale da eccitare il marcatore dell'analita da rilevare con potenze iniziali molto basse. Abbiamo scelto i metodi luminescenti perché sono indipendenti della quantità di analita in contatto con la superficie.

Si sono studiate le caratteristiche spettrali e spaziali dell'emissione laser e della fluorescenza in base alle condizioni specifiche del materiale organico legato sulla superficie.

Le attività per la realizzazione del programma di ricerca del Short Term Mobility sono state:

- Ottimizzazione della chimica di funzionalizzazione e di legame dell'antigene alla superficie della microsfera.

- Caratterizzazione delle microsfeere e di microbolle di silice e delle fibre rastremate per accoppiare la luce nei RWGM.
- Generazione di fluorescenza a due fotoni in microbolle riempite di rodamina 6G a bassa concentrazione. Rivelazione di fluorescenza a due fotoni con l'antigene marcato legato covalentemente alla superficie dei RWGM sferici.

2. Fabricazione dei microrisonatori

Per quanto riguarda la fabbricazione delle microsfeere è stato messo a punto un metodo che consente la realizzazione di microcavità con fattore di qualità Q superiore a 10^8 mediante fusione parziale della punta di una fibra ottica. Per la fabbricazione delle microbolle partiamo da un microcapillare di silice, con spessore iniziale della parete dell'ordine di qualche decina di micron. È possibile aumentare localmente il diametro della struttura in modo tale da ridurre considerevolmente lo spessore della parete iniziale fino all'ordine di pochi micron, realizzando così una microbolla lungo l'asse del capillare come mostrato in Figura 1.

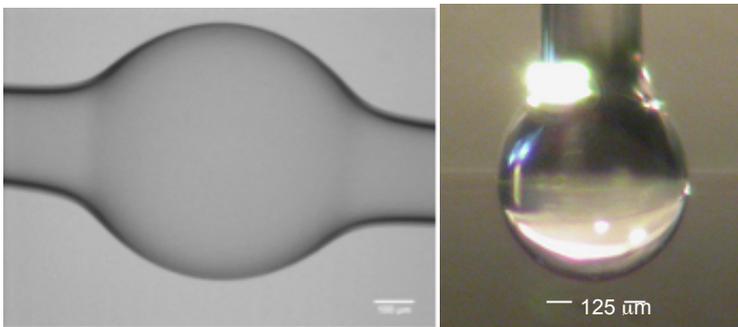


Figura 1. Immagine al microscopio ottico (a) (b) di una sfera in silice pura ottenuta sulla punta di una fibra ottica

3. Funzionalizzazione e caratterizzazione dei microrisonatori

Era stata avviata la collaborazione con **IQAC-AMRg**, grazie ai progetti bilaterali CNR-CSIC 2010-2012, per la messa a punto di un protocollo per la funzionalizzazione di microsfeere con un gruppo epoxy e derivatizzazione degli anticorpo marcati con diversi fluorofori. Gli anticorpi scelti sono IgG marcati con marcato con tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC) e anticorpi verso *Stafilococco Aureus*. *S. aureus* è responsabile di infezioni suppurative acute che possono essere dislocate in diversi distretti dell'organismo.

Il primo passo per realizzare il progetto, come detto sopra, è stato quello di funzionalizzare le microsfeere con gruppi attivi per l'immobilizzazione di biorecettori quali anticorpi che reagiscano con il loro specifico antigene.

Il protocollo usato è:

- Attivazione piranha $H_2SO_4:H_2O_2$ 4:1 v/v 3minuti, risciacquo e trattamento termico $110^\circ C$ per 1 ora
- Silanizzazione con GPTMS 0,01% in toluene anidro $60^\circ C$ 10minuti

- Immobilizzazione Proteina G 10mg/ml in fosfato 100mM pH8 per 2 ore, risciacquo in buffer e risciacquo in H₂O
- Immobilizzazione di IgG-TRITC a 1 µg/µl e 8 µg/µl in fosfato 100mM pH8 per 2 ore, risciacquo in buffer

Gli esperimenti fatti includono le misure dei Q di microsfere silanizzate e derivatizzate con l'anticorpo coniugato che mantengono un fattore di qualità elevato alla lunghezza di onda di 780 nm. Sono stati testate a questa lunghezza in quanto lunghezza ottima per l'eccitazione a due fotoni del fluoroforo. La figura 2 mostra uno schema del sistema sperimentale con il quale viene misurato il fatto re di qualità delle microsfere e microbolle.

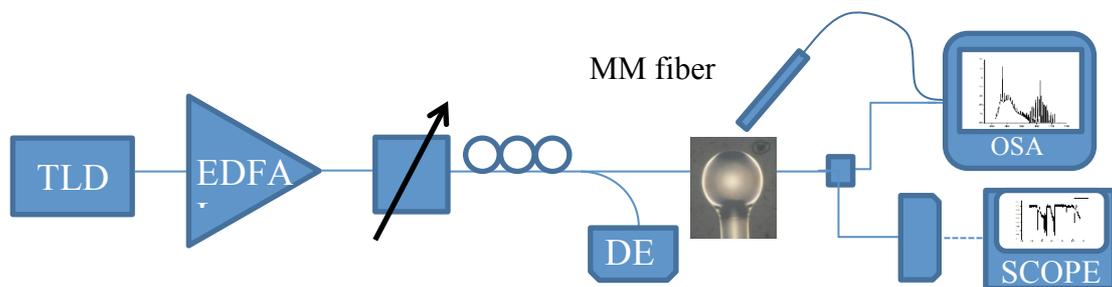


Figura 1. Schema del montaggio sperimentale: TLD: laser tunabile, EDFA amplificatore, DE: rivelatore, OSA: analizzatore di spettro, SCOPE: oscilloscopio.

Il Q misurato è di circa 10^6 (figura 3) per le microsfere silanizzate e derivatizzate con il protocollo descritto sopra. Il grafico mostra il segnale trasmesso all'oscilloscopio.

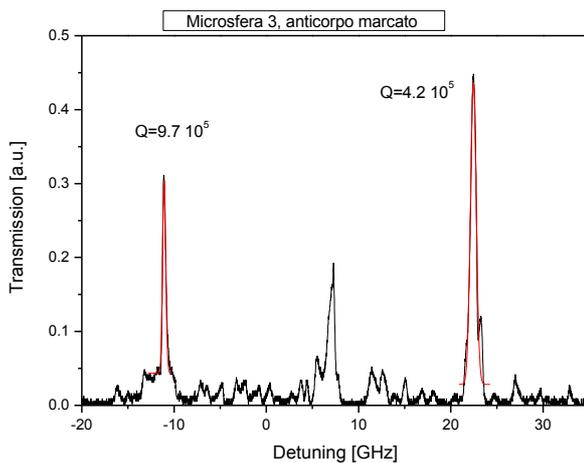


Figura 3. Misura sperimentale del fattore di qualità Q delle microsfere derivatizzate con il protocollo di legame covalente.

4. Misure di fluorescenza a due fotoni

Per realizzare le misure di eccitazione della fluorescenza a due fotoni sono stati testati due approcci: i) eccitazione del modo di galleria e TPF a fascio libero mediante un microscopio confocale modificato; ii) eccitazione del modo di galleria e TPF mediante con una fibra rastremata.

Il confocale modificato parte da un microscopio ottico rovesciato Nikon TE2000U pompato con un sistema Laser al femtosecondo Coherent, costituito da un Laser di pompa Nd:YVO4 duplicato (6 W, 532 nm Verdi V-5) e da un oscillatore Ti:Sapphire (900mW, 700-980 nm, frequenza di ripetizione 76 MHz, impulso 150 fs, larghezza di riga 8,5 nm, Mira 900 f) e un sistema di scansione con due specchi galvo. Questo microscopio consente di realizzare misure a due fotoni. La rivelazione è stata fatta mediante una CCD. La figura 3 mostra il montaggio sperimentale usato.

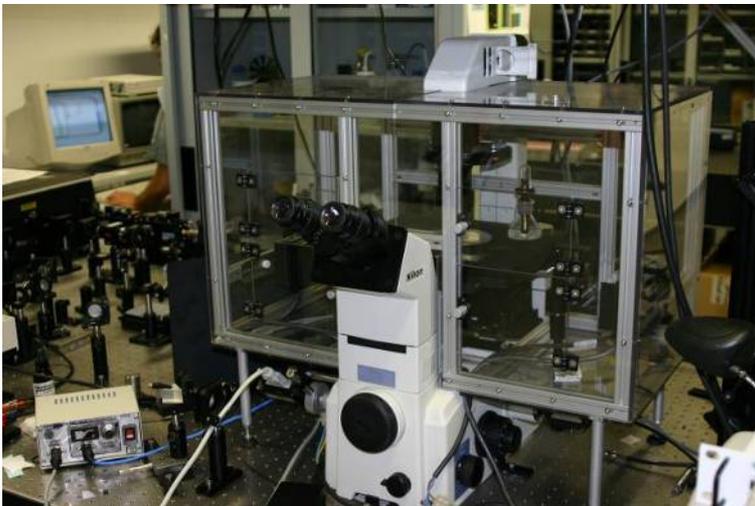


Figura 3. Microscopio confocale modificato presso ICFO-Istituto di Scienze Fotoniche.

Abbiamo misurato per prima la fluorescenza a due fotoni di una microbolla riempita di una soluzione di Rodamina 6G con concentrazione $1 \cdot 10^{-6}$. Il set di filtri usati sono due, il primo è per la rivelazione a due fotoni e il secondo è specifico per la rodamina. L'obiettivo utilizzato in questo caso è un 10x, l'intensità è stata misurata mediante un programma labview di trattamento di immagini. Le misure sono state fatte variando la potenza d'ingresso al microscopio, iniziando dalla potenza massima 402 mW fino a che la fluorescenza non poteva essere rilevata dalla CCD. La potenza al piano focale del microscopio si riduce al 30% della potenza di ingresso. La figura 4 mostra un'immagine ottica della microbolla per una potenza di 190 mW all'ingresso del microscopio, dove si osservano i due lobi corrispondenti al modo di galleria, e il corrispondente profilo d'intensità lungo il diametro. La figura 5 mostra il grafico della dipendenza della potenza delle laser nel piano del campione verso la fluorescenza emessa. La scala è log-log, il fit lineare ha una pendenza di $1,81 \pm 0,1$ in corrispondenza con la teoria.

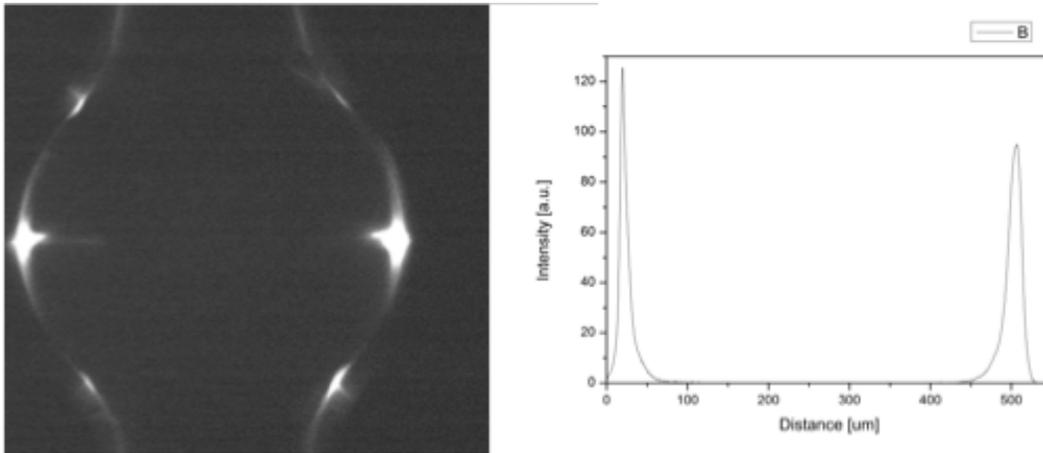


Figura 4. Immagine al microscopio della fluorescenza a due fotoni eccitata dai modi di galleria e profilo d'intensità lungo il diametro della microbolla.

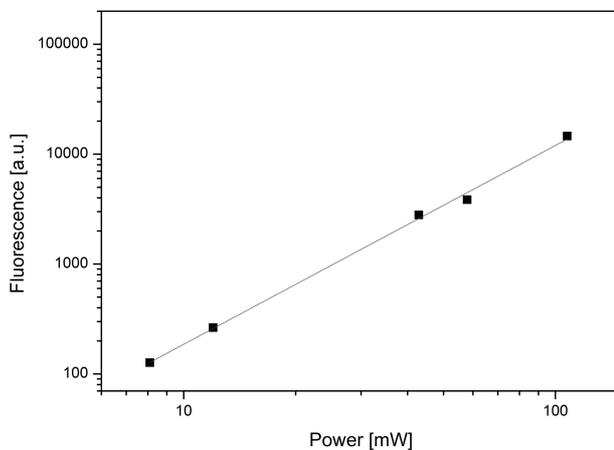


Figura 5. Potenza del laser versus intensità di fluorescenza in scala log-log. La linea nera è il fit lineare con pendenza di circa 2.

Dopo aver dimostrato il funzionamento con i risonatori a microbolla, abbiamo testato le microsferi silanizzate e derivatizzate con gli anticorpi marcati. Nella figura 6 si mostra l'immagine della microsfera dove sono visibili il punto di accoppiamento e parzialmente il modo di galleria. La differenza rispetto alle misure precedenti è dovuta in parte al fatto che le sfere sono coperte con un monostrato di anticorpi marcati, con un minor densità di fluoroforo rispetto alla soluzione micromolare con la quale si è riempita la bolla.

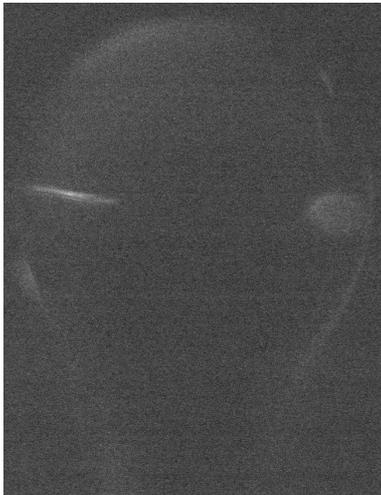


Figura 6. Immagine di una microsfera silanizzata e derivatizzata con IgG marcata con TRITC.

Dopo aver dimostrato la fattibilità dell'eccitazione della fluorescenza a due fotoni accoppiando la luce a fascio libero, si è provato a realizzare la stessa misura mediante l'accoppiamento mediante fibra rastremata.

La figura 7 mostra lo schema del montaggio sperimentale in cui un laser a Titanio:Zaffiro (stesso modello descritto sopra) è accoppiato a un amplificatore regenerativo per ridurre la durata dell'impulso a 1ps e la frequenza di ripetizione a 1 kHz. La luce amplificata viene accoppiata a un loop di 140 m di fibra per ridurre la durata dell'impulso al 102 ps e introdurre un ritardo di 22ns. Il ritardo serve per separare la luce bianca generata all'interno della fibra dalla fluorescenza a due fotoni (luce bianca: inserto in basso a sinistra). La fluorescenza viene coltetta da un obiettivo con apertura numerica 0.65 e mandata ad un fotomoltiplicatore.

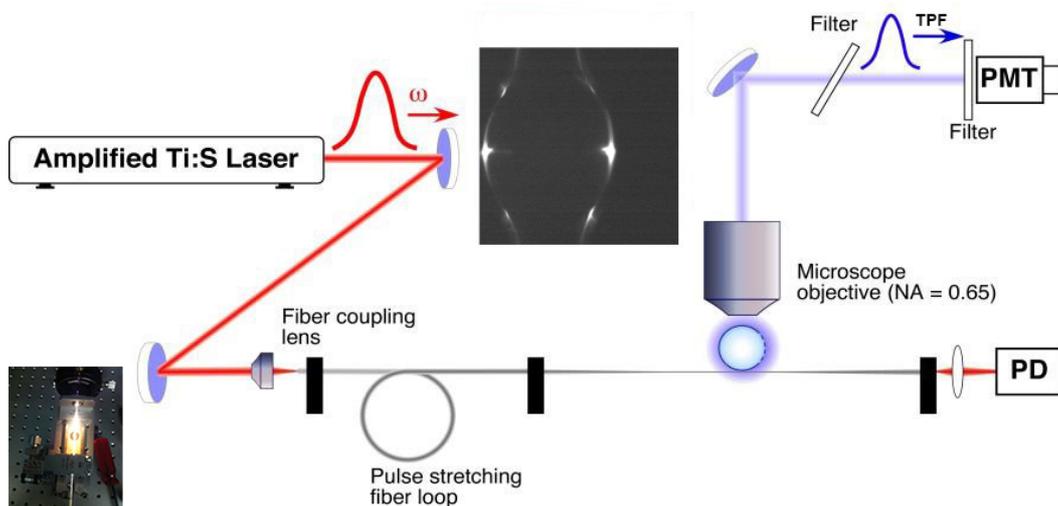


Figura 7. Montaggio sperimentale per l'accoppiamento con fibra rastremata.

Purtroppo le misure realizzate con l'accoppiamento a fibra rastremata non sono state concludenti. Il motivo principale è stato l'impossibilità di filtrare temporalmente la luce bianca. Il tempo di vita delle nostre cavità è di circa 1 ns ($Q = \omega\tau = 4 \cdot 10^5 - 9 \cdot 10^5$), il ritardo introdotto dal loop di fibra è di 22 ns, ma la riduzione in potenza nella regione rastremata introdotta dal loop di fibra è tale da non poter generare efficientemente fluorescenza a due fotoni.

5. Conclusioni

Il principale obiettivo di questo progetto è stato raggiunto. La ***generazione di fenomeni non lineari di terzo ordine in microrisonatori ottici ibridi***, sono stati studiati, in particolar modo la fluorescenza a due fotoni e la generazione di nuove frequenze. Le difficoltà tecniche non hanno consentito di testare l'approccio con la fibra rastremata, ma i risultati ottenuti con l'approccio fascio libero ci hanno consentito di sottomettere un abstract a Photonics West, 7-12 Febbraio 2015, San Francisco (USA).

In più si è consolidata la collaborazione tra CNR-IFAC e ICFO-Istituto di Scienze Fotoniche con la firma di un "Memorandum of Understanding".