

## Raport de deplasare

**1. Solicitant: Tosa Nicoleta**

**2. Departamentul: Fizica Moleculară și Biomoleculară, Echipa de cercetare: Procese induse cu laser**

**3. Tipul acțiunii: VS (Visiting Scientist)**

**4. Scopul deplasării: consolidarea colaborării cu grupuri de cercetare pe tematica “Time-resolved Microscopy and Correlation Spectroscopy” din cadrul companiei PicoQuant**

**5. Destinația: Berlin, Germania**

**6. Perioada: 17.02. – 24.02.2019**

**7. Necesitatea, beneficiile și rezultatele deplasării:**

Tehnologia de procesare a materialelor cu laser femtosecundă a atras un interes extraordinar în comunitățile științifice și tehnologice. Studiile au arătat că difracția creează o dificultate majoră pentru a obține structuri 3D cu dimensiuni micrometrice sau submicrometrice. Litografia Optică Cuantică a permis depășirea limitării produse de difracție prin utilizarea unor noi metode și materiale (vitroceramici fluorescente fotosensibile, fotorezist). Cel mai eficient material suport cunoscut până acum pentru stimularea luminiscentei în domeniul vizibil, albastru și verde, este cristalul cu structura hexagonală NaYF<sub>4</sub> dopat cu lantanide. Acest tip de substrat este folosit la scară largă pentru obținerea de fibre optice, celule solare și detectori pentru testele de imunitate, ca metodă alternativă pentru stimularea conversiei cu nanoparticule coloidale sau nanocristalite.

Prin sinteza chimică și controlul structural al materialelor foto-luminiscente, în care elementul ytriu a fost înlocuit cu un pământ rar de tipul samariului, am obținut deja săruri complexe cu proprietăți de luminiscentă și aplicații în fabricarea de dispozitive optoelectronice, inscripționare și stocare judicioasă de date în sticle vitroceramice, polimeri etc. Existența proprietăților de luminiscentă ale sărurilor sintetizate în laborator a putut fi evidențiată în institutul nostru (în laboratorul de laser femtosecundă) prin utilizarea microscopiei de fluorescență (epifluorescență) steady-state. Folosirea acestor

compuși în dezvoltarea de procese induse cu laserul necesită o caracterizare mai complexă din punct de vedere al microscopiei și spectroscopiei de fluorescență. Din acest motiv s-a inițiat colaborarea cu grupul de cercetare pentru investigații de superrezoluție STED (Dr. Olaf Schulz) pe tematica de microscopie rezolvată în timp și spectroscopie de corelare din cadrul companiei PicoQuant, Berlin, Germania.

Colaborarea s-a realizat pe două direcții:

- (i) caracterizarea fluorescenței fluorurii complexe de sodiu și samariu ( $\text{NaSmF}_4$ ) în filme prin microscopie confocală utilizând pentru excitare laser în regim continuu și pulsant, respectiv prin microscopie de fluorescență rezolvată în timp (FLIM);
- (ii) prelucrarea datelor și identificarea timpilor de viață ai fluorescenței  $\text{NaSmF}_4$  cu ajutorul PicoQuant pe tematica "Time-resolved Microscopy and Correlation Spectroscopy".

#### Rezultate obținute:

Filmele de  $\text{NaSmF}_4$  au fost inițial investigate și caracterizate în INCDTIM prin microscopie optica în epifluorescență (steady-state) realizând excitarea în domeniul 400-440 nm, respectiv 530-55 nm, având o emisie în domeniul 475-575 nm (Fig. 1).

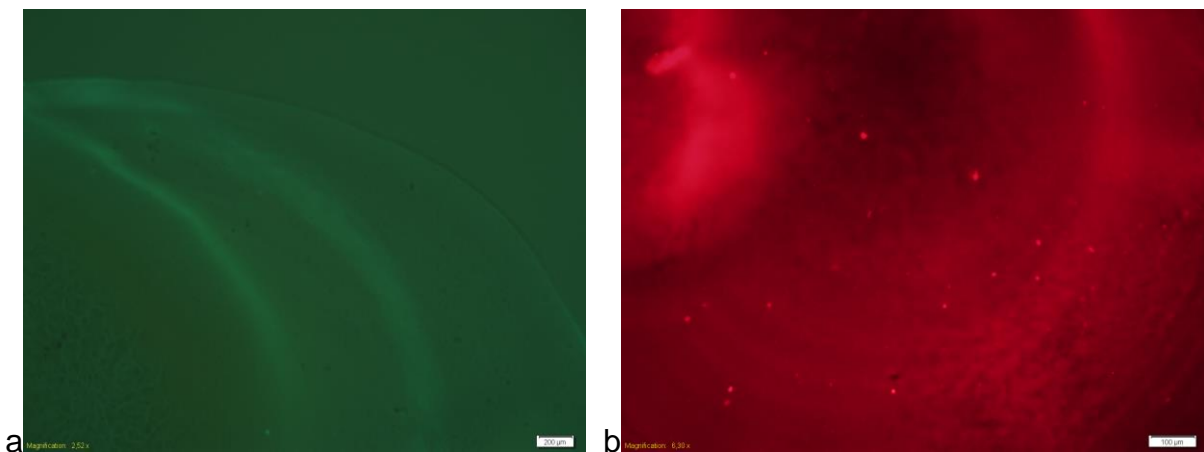


Fig. 1 Imagine de microscopie optică în epifluorescență, înregistrată în film  $\text{NaSmF}_4$ , la o excitare în domeniul: a. 400-440 nm, emisie peste 475 nm (DM 455, BA 475), mărire 4x b. 530-550 nm, emisie peste 590 nm (DM 570, BA 590), mărire 10x.

Beneficiile aduse de această mobilitate rezidă în faptul că investigarea acestor noi materiale, prin microscopie de fluorescență confocală și rezolvată în timp, a oferit informații suplimentare legate de timpii de stingere ai fluorescenței acestui compus în asociere cu imagini de fluorescență caracteristice.

Imaginile de fluorescență înregistrate prin microscopie confocală de scanare cu radiație laser de 406.8 nm, în regim continuu, au confirmat răspunsul anterior obținut în epifluorescență la excitare cu 400-440 nm. Astfel, intensitatea emisiei fluorescente este ușor diminuată când se micșorează câmpul vizual (pinhole) de la 17 $\mu$ m (Fig. 2a) la 1.85  $\mu$ m (Fig. 2B):

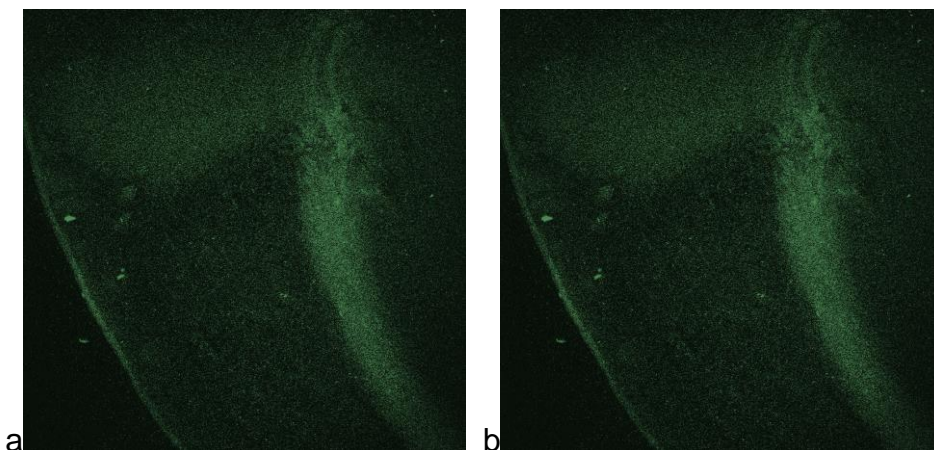


Fig. 2 Imagini de fluorescență înregistrate în film de NaSmF4 prin microscopie optică confocală la scanare cu laser continuu de 406.8 nm utilizând o apertură de: a. 17 $\mu$ m; b. 1.85  $\mu$ m, la o mărire de 10x, folosind o oglinda dicroica DM450 nm.

Înregistrarea imaginilor la o mărire superioară (20x), cu un câmp vizual micșorat, și viteza de scanare foarte mare – regim rezonant- indică o amplificare a fluorescenței (Fig. 3a).

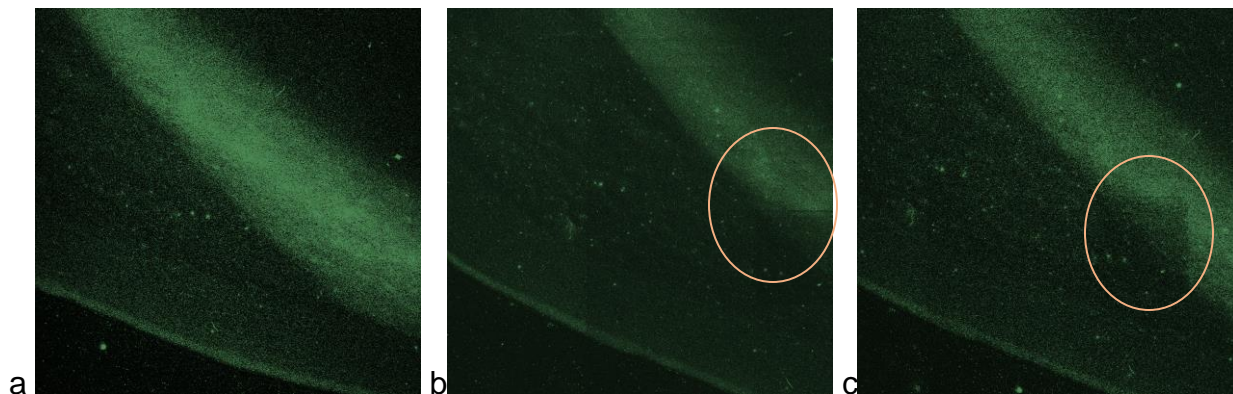


Fig. 3 Imagini de fluorescență înregistrate în film de NaSmF4 prin microscopie optică confocală la scanare cu laser continuu de 406.8 nm, utilizând o apertură de 1.85  $\mu$ m, la o mărire de 20x, cu o oglinda dicroică DM450: a. în regim rapid (rezonant); b. în regim de scanare lent (cu oglinzi galvanice); c. după scanare în regim lent (postbleaching).

Prin utilizarea oglinzilor galvanice în procesul de scanare, adică investigarea într-un regim foarte lent, se observă o scădere vizibilă a fluorescenței, atât în timpul scanării (Fig. 3b), cât și după scanare (Fig. 3c). Acest fapt subliniază că puterea laserului are un rol determinant atât în generarea emisiei NaSmF<sub>4</sub>, cât și în gestionarea timpului de viață al acesteia, precum și în alegerea regimului de scanare pentru evitarea fenomenul de “autostingere” a fluorescenței.

Comutarea excitației filmelor de NaSmF<sub>4</sub> pe 440 nm aduce cu sine o scădere dramatică a intensității fluorescenței când se utilizează 50% din puterea laserului (50 mW) (Fig. 4a), respectiv o ușoară creștere când se lucrează la putere maximă (100 mW) (Fig. 4b), precum și un domeniu extins de emisie - de la 525 nm (Fig. 4c) la 663-738 nm (Fig. 4d):

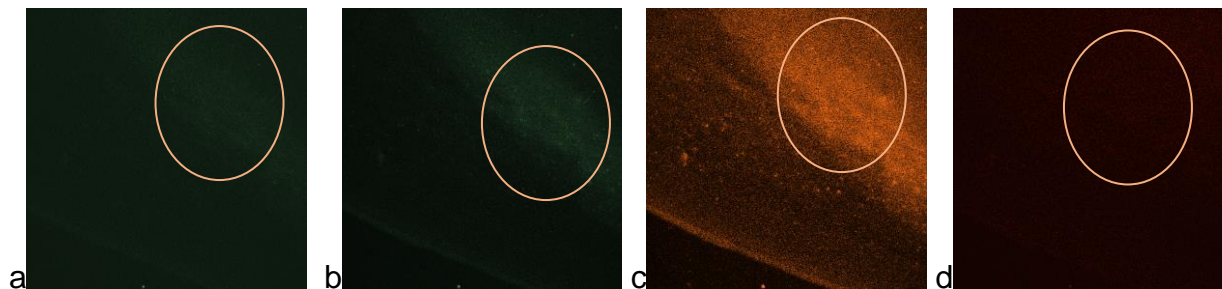


Fig. 4 Imagini de fluorescență înregistrate în film de NaSmF<sub>4</sub> prin microscopie optică confocală la scanarea cu laser continuu de 440 nm, în regim rapid (rezonant), utilizând o apertură de 1.85  $\mu$ m, la o mărire de 20x, cu o oglinda dicroica DM450: a. la o putere de 50 mW; b. la o putere de 100 mW; c. la o putere de 100 mW, cu filtru pentru emisie de la 525 nm; c. la putere de 100 mW, cu filtru pentru emisie de la 663 la 738 nm.

Și în acest caz, puterea laserului are influența decisivă în producerea răspunsului de fluorescență, acesta din urmă fiind mai slab decât în cazul excitației cu 406.8 nm. De asemenea, emisia fluorescenței se extinde pe un interval spectral lărgit (525-738 nm), în funcție de filtru utilizat.

Corelarea acestor informații cu imaginile deja obținute ne vor permite să rafinăm și să completăm datele spectroscopice anterior obținute prin spectroscopia de fluorescență rezolvată în timp, realizată în laboratorul de procesare cu laser din institutul nostru. Continuarea investigațiilor de determinare a timpilor de scadere a fluorescenței, prin excitația cu cele două lungimi de undă identificate și confirmate, vor permite utilizarea sărurilor de acest tip în procese de litografie prin scriere directă cu laserul pentru

Litografia Optică Cuantică (LOC). Aceasta va deschide o nouă perspectivă pentru generare de dispozitive optice pentru senzori biologici.

Au fost investigate pe larg și aspecte ale microscopiei de fluorescență rezolvată în timp (FLIM), corelată cu tehnica TCSPC (time-correlated single photon counting) pentru determinarea timpilor de viața ai fluorescenței diferitelor substraturi. Influența ambianței moleculare, dinamica moleculară, viscozitatea matricei de investigare asupra timpului de viața al fluorescenței fluoroforilor, modul de transferare al energiei – radiative și neradiativ, precum și parametrii tehnici ai echipamentelor dedicate investigațiilor FLIM (frecvența de repetiție a sursei laser, durata pulsului, tipul și sensibilitatea detectorului, electronica montajului) sunt reflectate în funcția de răspuns a aparatului și implicit, în timpii de viața ai fluorescenței probei investigate. S-a discutat pe larg despre modalitățile de a obține cât mai fidel răspunsul aparatului, precum și despre metodele de fitare a datelor experimentale obținute (Fig 5a).

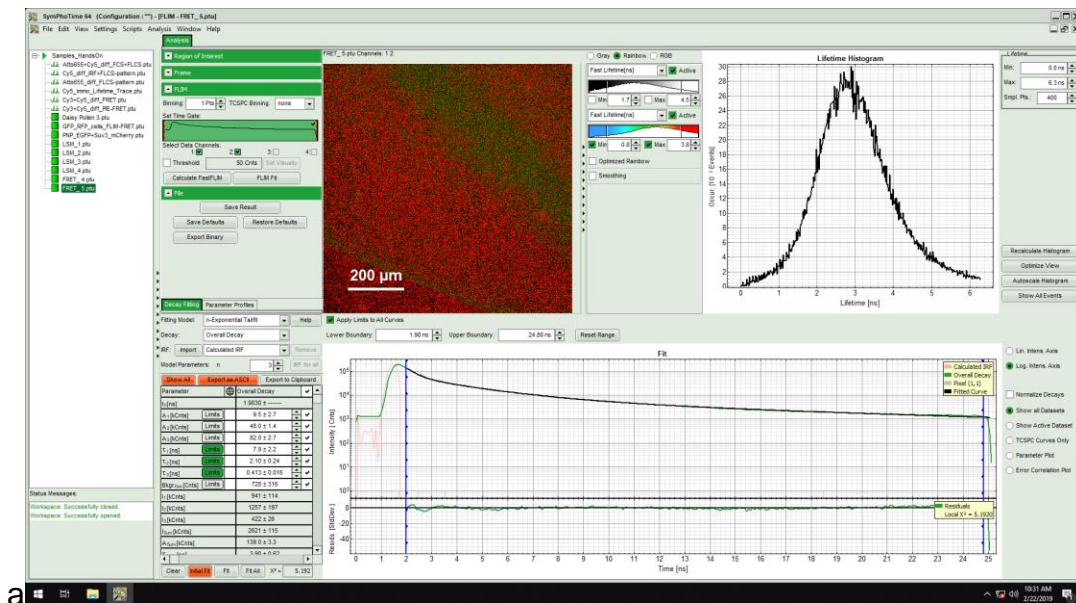


Fig. 5 Fitarea datelor prin metoda Tailfit care aplică funcția de fitare exponențială (cu una, doua, trei exponențiale) doar pe porțiunea descendentă a curbei de distribuție a intensităților în funcție de timp.

Fitarea datelor se poate face fie aplicand funcția de fitare cu trei exponențiale doar pe porțiunea descendentă a curbei de distribuție a intensităților în funcție de timp (Tailfit), obținându-se trei timpi  $\tau_1=7.9\pm 2.2$  ns,  $\tau_2=2.0\pm 0.24$  ns și  $\tau_3=0.413\pm 0.016$  ns.

Utilizând o reconvoluție a curbei de distribuție a intensităților în funcție de timp cu funcția de răspuns a instrumentului, nivelul de încredere va fi mai ridicat (Fig. 6), dar vor fi doar doi timpi  $\tau_1=2.20\pm 0.03$  ns și  $\tau_2=0.4762\pm 0.0096$  ns:

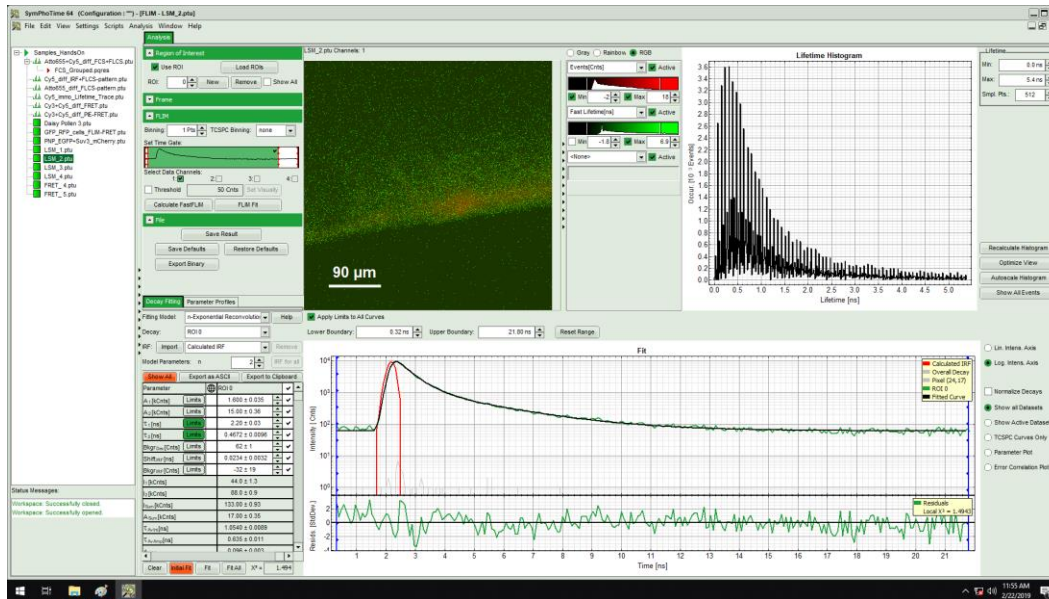


Fig. 6 Fitarea datelor prin metoda reconvoluției care combină funcția de fitare exponențială (cu una, doua, trei exponențiale) a curbei de distribuție a intensităților în funcție de timp cu funcția de răspuns a instrumentului.

Principalul efect ale acestei mobilități de tip VS a constat în inițierea unei teme CDI comune pe tematica investigării prin microscopie de fluorescență rezolvată în timp și spectroscopie de corelare a unor complecsi pe bază de pământuri rare, în particular samariu, în acest sens fiind acceptate un numar de 10 probe pentru investigare specifică (microscopie confocală, FLIM, STED) deja demarată.

In aceea perioada a avut loc si un curs de microscopie de fluorescena si spectroscopie de corelatie, care a avut atat sectiuni de prezentari, cat si activitati experimentale in directa corelare cu tematicile prezentate: “Introduction to (Fluorescence) Microscopy”, Prof. Jan Willem Borst, Wageningen University, Olanda, “Förster Resonance Energy Transfer”, sustinuta de Prof. Fred S. Wouters, Universitatea de Medicina, Göttingen, Germania, “Introduction to Fluorescence Fluctuation spectroscopy: *Analysing ‘noise’* “, sustinuta de Prof. Mark Hink, Universitatea din Amsterdam, Olanda, “Fluorescence lifetime imaging”, sustinuta de Prof. Chris Dunsby, Imperial London college, United Kingdom.

Rezultatele colaborării se vor reflecta în utilizarea datelor obținute pentru redactarea și publicarea unui articol cu factor de impact în decursul unui an de la încheierea mobilității.

Acțiunea de mobilitate a permis stabilirea, prin doctoranda Grace Bramer, participantă la curs, a unui contact cu grupul de Optică Medicală condus de Prof. Martin Frenz, de la Institutul de Fizică Aplicată din cadrul Universității din Berna, Elveția, în vederea unor colaborări utile dezvoltării proiectului dedicat investigării prin tomografie de coerență optică (OCT).

Acțiunea de mobilitate a contribui implicit la dezvoltarea personală prin dobândirea de abilitați pentru microscopia de fluorescență rezolvată în timp, complementare celor de microscopie optică în epifluorescență și spectroscopie de fluorescență, precum și la o eficientizare a tehnicilor de litografie laser pe care le utilizez curent în activitatea de cercetare-dezvoltare-inovare. De asemenea, colaborarea în cadrul grupului de cercetare va permite diseminarea informațiilor dobândite și în măsura posibilităților, inițierea unei direcții de cercetare complementară celor deja existente în grup și în institut, aspecte care vor contribui la dezvoltarea grupului de cercetare din care fac parte, precum și la dezvoltarea instituțională.