



Microscopía Raman Confocal Microscopia de Fuerza Atómica Difracción de Rayos X –Ángulo Bajo



Dr. Ricardo Faccio
Centro NanoMat/DETEMA
Facultad de Química
Universidad de la República
rfaccio@fq.edu.uy



Mayo de 2019 1

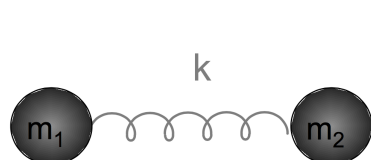
Punteo

- ▣ Modos Vibracionales
- ▣ Reglas de Selección: IR vs Raman
- ▣ Microscopia Óptica y Confocal
- ▣ Microscopia Raman Confocal
- ▣ Aplicaciones de Microscopía Raman Confocal
- ▣ Microscopia de Fuerza Atómica
- ▣ Modos de Medida
- ▣ Aplicaciones de Microscopía de Fuerza Atómica

Mayo de 2019

2

1. Modos Vibracionales



$$V = \frac{1}{2} kx^2$$

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}; \quad \frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2}$$

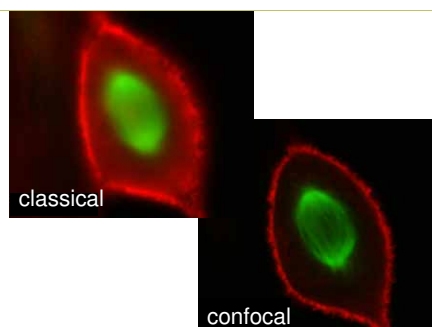
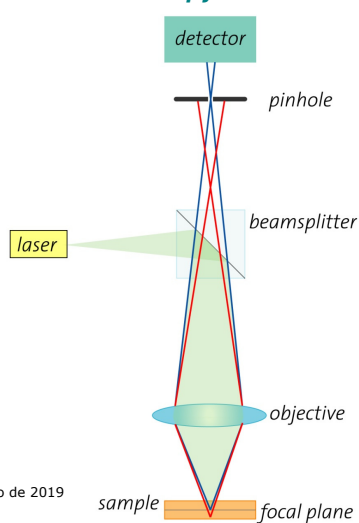
Bond	Bond Energy [kcal (kJ)]	Stretching Frequency (cm ⁻¹)
<i>Frequency dependence on bond energies</i>		
C—C	83 (350)	1200
C=C	146 (611)	1660
C≡C	200 (840)	2200
	↓ stronger bond	↓ $\bar{\nu}$ increases
Bond	Bond Energy [kcal (kJ)]	Stretching Frequency (cm ⁻¹)
<i>Frequency dependence on atomic masses</i>		
C—H	100 (420)	3000
C—D	100 (420)	2100
C—C	83 (350)	1200
	↓ heavier atoms	↓ $\bar{\nu}$ decreases

Mayo de 2019

3

3. Microscopia Confocal

confocal microscopy



- much smaller background
- 3-D information
- slightly higher resolution possible

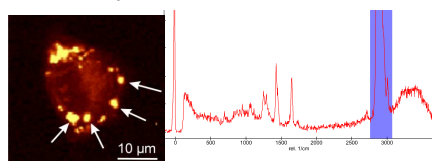
spatial, but NO chemical information

Mayo de 2019

3. Microscopio Confocal + Espectroscopia Raman

3-D Imaging with chemical sensitivity

- take a complete Raman spectrum at every image pixel
- extract the relevant information (peak intensity, width, position etc.)
- display this information as image

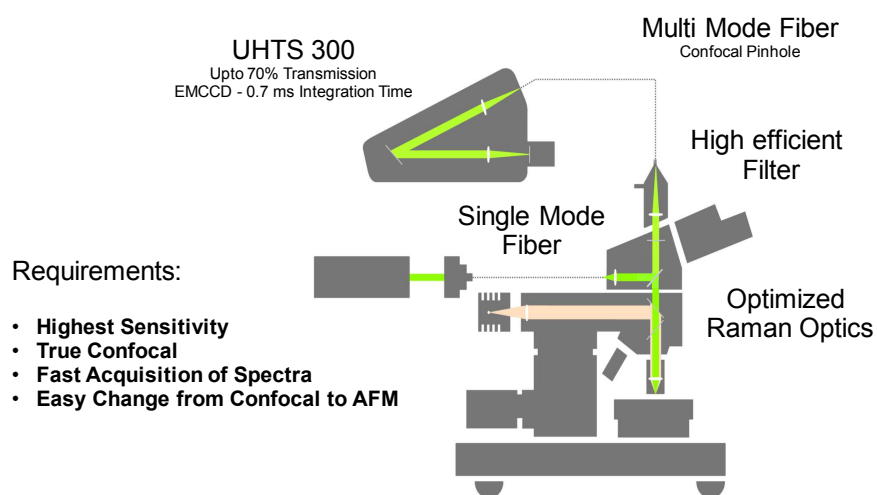


Parque Científico y Tecnológico de Pando (PCTP) /
 Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP)
 ANII- Proyecto EQC_X_2012_1_14

Mayo de 2019

5

3. Esquema



Mayo de 2019

6

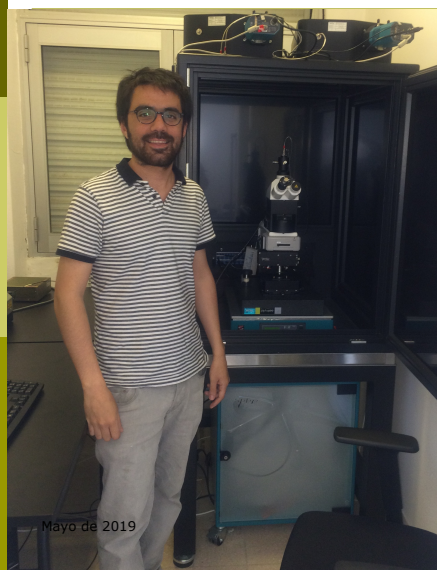
3. Características de la Técnica

- ▣ No Destructivo
- ▣ Identificación Química Directa
- ▣ Identificación de Propiedades de Materiales
- ▣ Fácil o nula preparación de muestra
- ▣ Sólidos cristalinos, sólidos amorfos y Líquidos
- ▣ Detección 3-dimensional
- ▣ Variación de Temperatura (Linkam)
- ▣ Combinación de detección química con AFM (EFM & MFM)

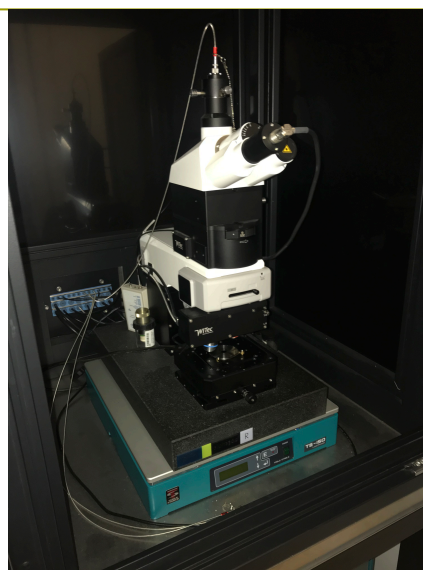
Mayo de 2019

7

3. Disposición



Mayo de 2019



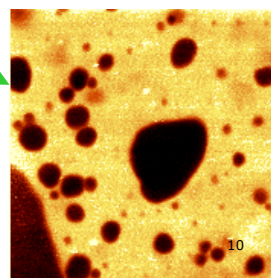
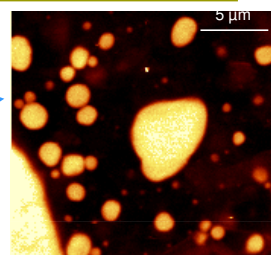
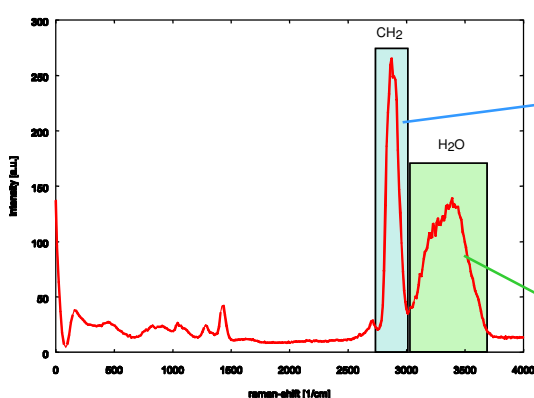
4. Aplicaciones

Microscopia Raman Confocal

Mayo de 2019

9

Imagen Raman: dispersión agua-aceite



Body lotion, imaging parameters:

2 mW excitation @ 532nm, 100x oil, NA=1,25

20 x 20 μm, 180 x 180 pixels (= 32400 spectra)

Mayo de 2019

50ms/spectrum

Reconstrucción Imagen Raman 3D

Sample: Oil/Water Emulsion

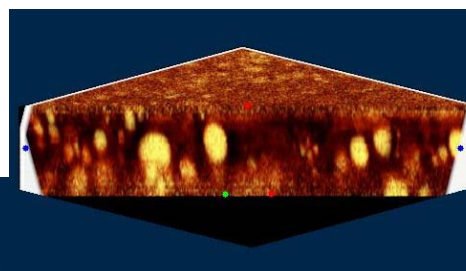
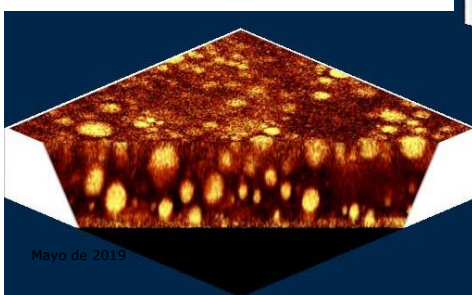
3-D Reconstruction

Evaluated Band: CH-Stretching

Excitation: 532nm

Scan Range XY: 100x100 μm

Scan Range Z: 30 μm /32 layers



Total number of Spectra: 517 500

Total Acquisition Time: 23 min

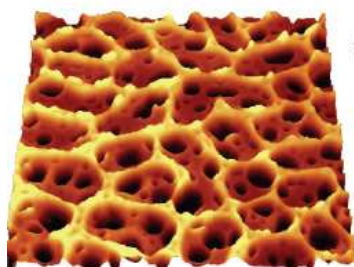
Mayo de 2019

11

Polímeros

Thin Film of PMMA - PET

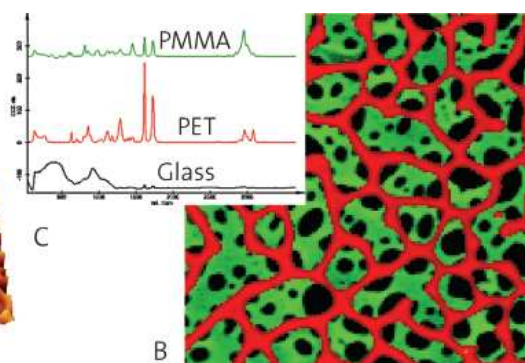
AFM image



A
20x20x0.2 μm^3 scan area

Mayo de 2019

Raman image



B
20x20 μm^2 scan area, 150x150 pixel
•0,05 s integration time
•total 22500 spectra

12

Blend PMMA+SBR

Fig. 5: Overview AFM image of a PMMA-SBR blend.

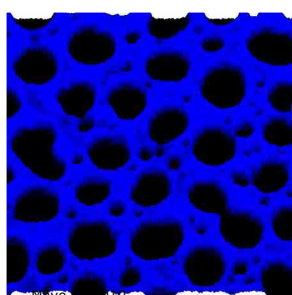
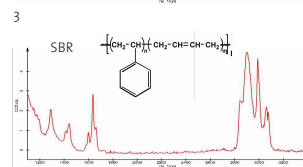
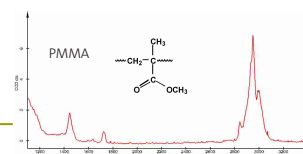
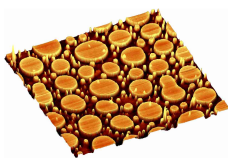


Fig. 9: Color coded Raman image of SBR resulting from the integral intensity of each spectrum.

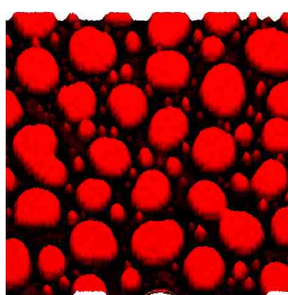


Fig. 10: Color coded Raman image of PMMA resulting from the integral intensity of each spectrum.

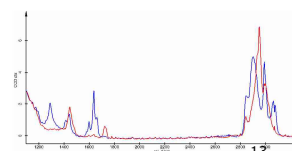


Fig. 11: Corresponding spectra: SBR (blue) and PMMA (red).

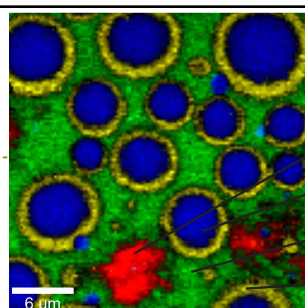


Fig. 2a: Raman Image of an emulsion used in food production. Scan range: 30 μm x 30 μm, 120x120 pixels (=14400 spectra, 532 Nd:Yag Laser for excitation, 100 x oil objective (NA=1.25)). Red + green: fatty matrix, blue: aqueous phase, yellow: emulsifier PGPR

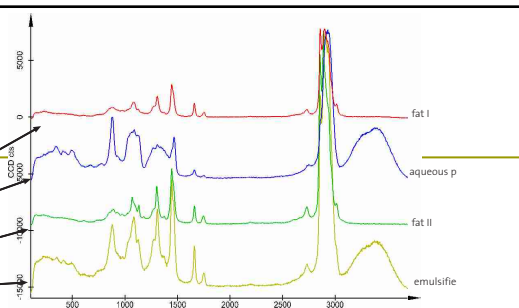
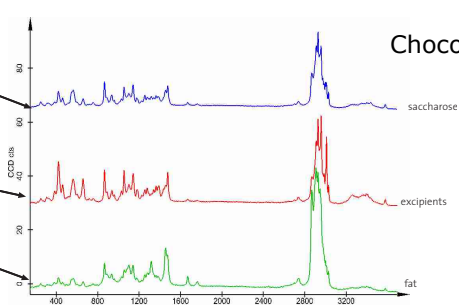
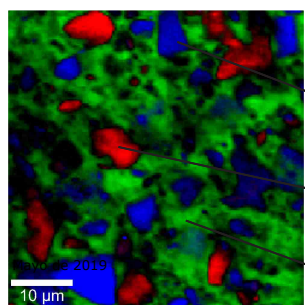


Fig. 2b: Corresponding spectra of the compounds contained within the emulsion.

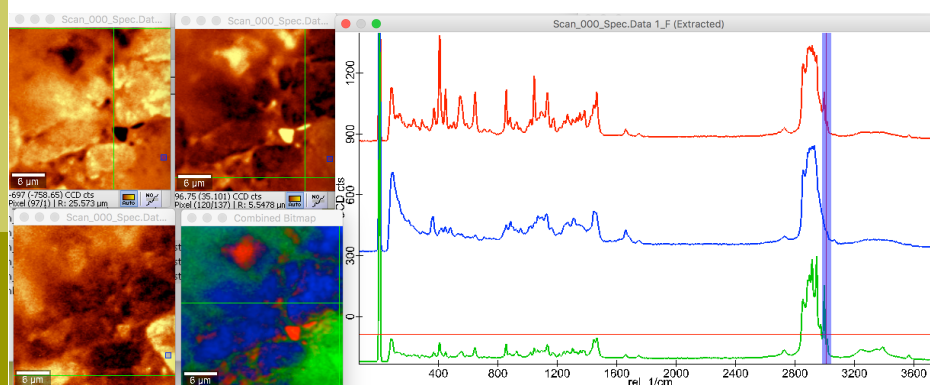


Chocolate blanco

14

Chocolate Blanco (toblerone)

□ Sacharose, Maltose and Fats

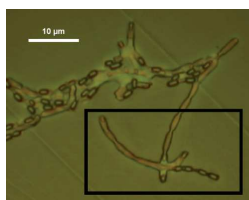


Mayo de 2019

15

Células Bacterianas

Characterization and Detection of Metabolic Compounds



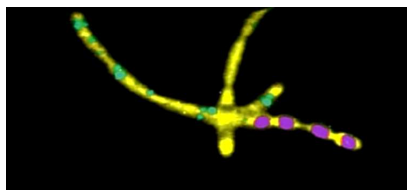
Bacillus Cereus

Three cellular components

Yellow: vegetative cells

Green: incorporation traces of PHB

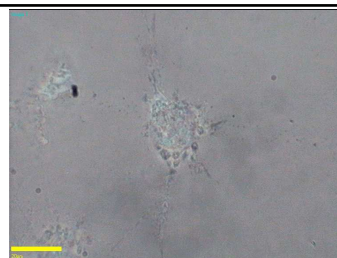
Magenta: spores after stationary growth phase



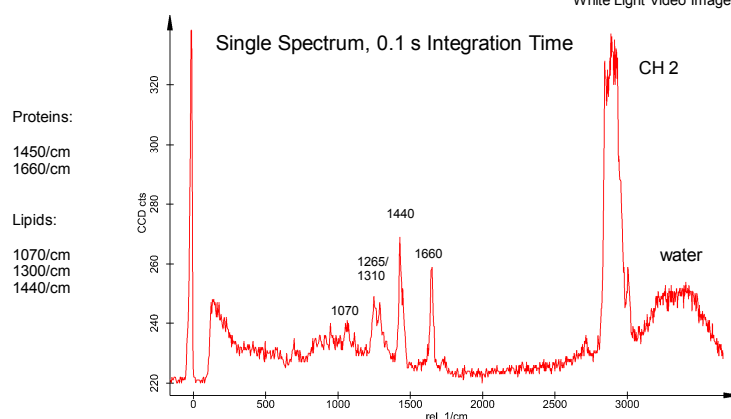
→ Diagnostic power to identifying phenotypic heterogeneity

Courtesy A. Hermelink, RKI, Berlin: Hermelink et al (2009)
The Analyst, 134, 1149-1153

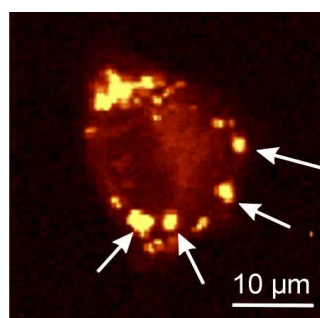
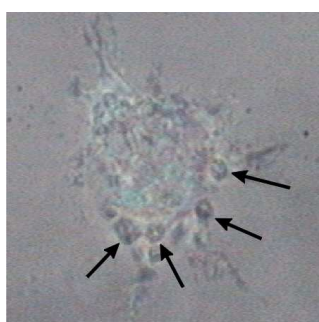
Células Vivas: células epiteliales de Rata



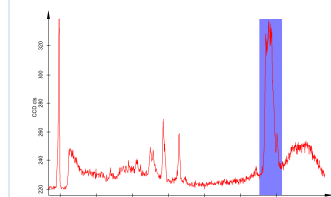
White Light Video Image



Células epiteliales en Buffer

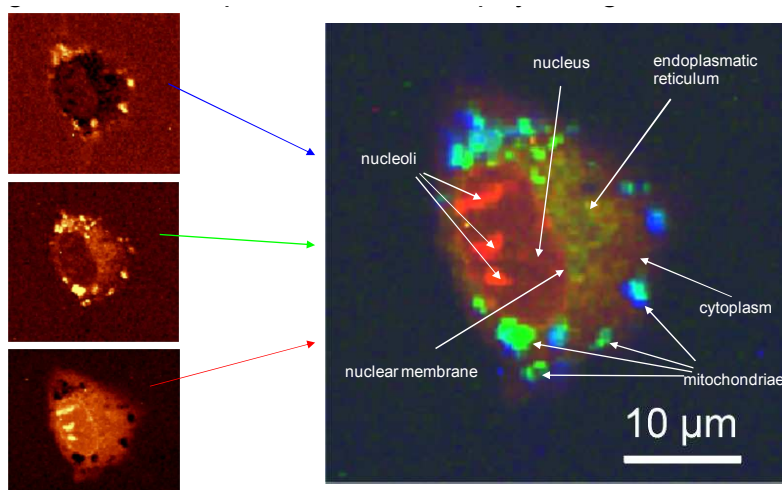


Intensity in the CH 2 stretching band
(2800 - 3000 / cm)

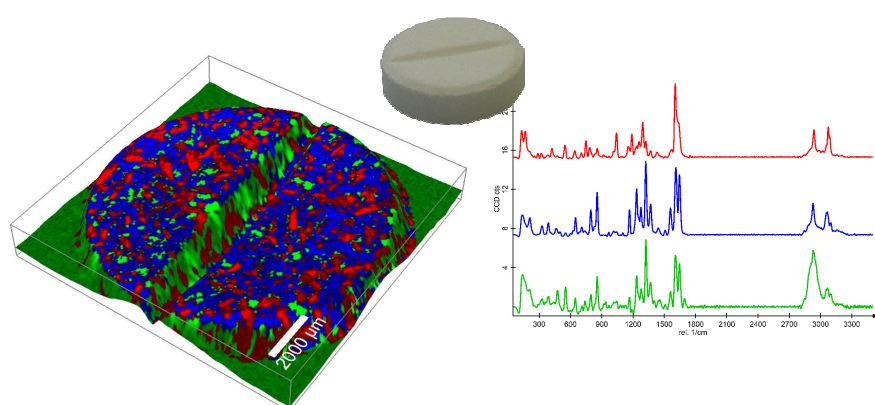


100 x 100 pixel = 10000 spectra
objective: 60x, NA = 1.0 water
532 nm excitation, 5 mW
100 ms / spectrum => 17 min.

Imagen reconstruida



Tabletas: API y Excipientes



Confocal Raman Image overlaid
on the topography

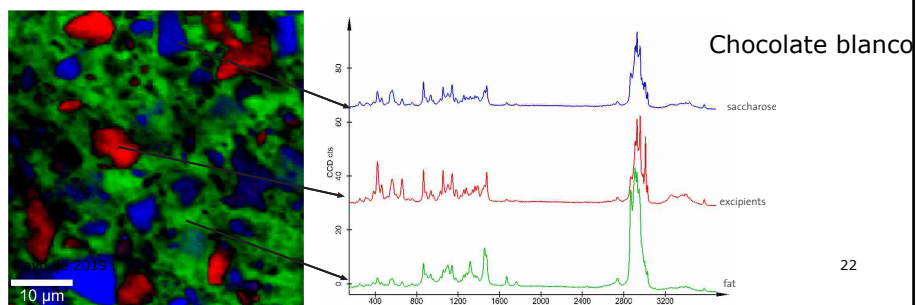
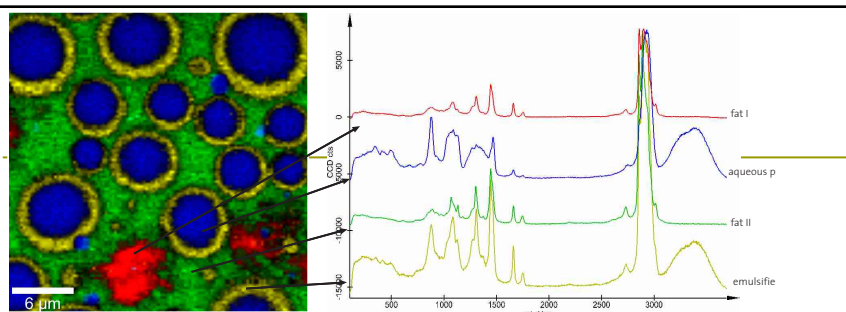
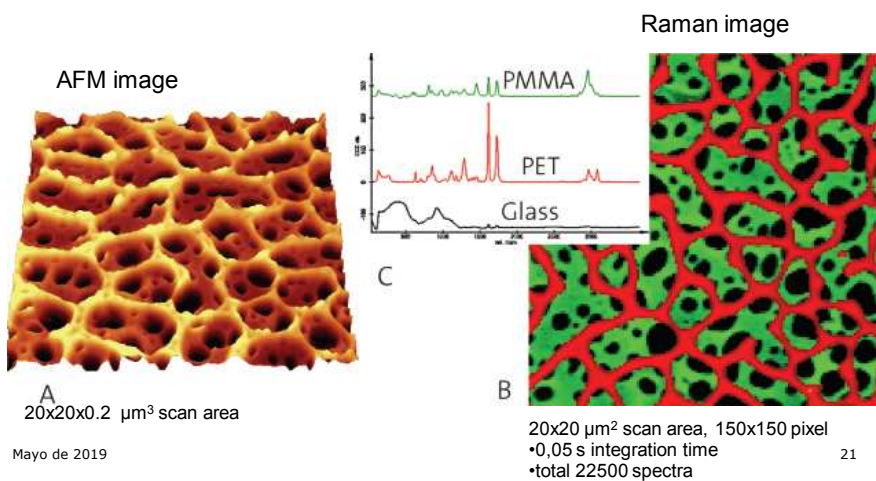
Corresponding Spectra
Red & Blue : API
Green : Excipient

Mayo de 2019

20

Polímeros

Thin Film of PMMA - PET



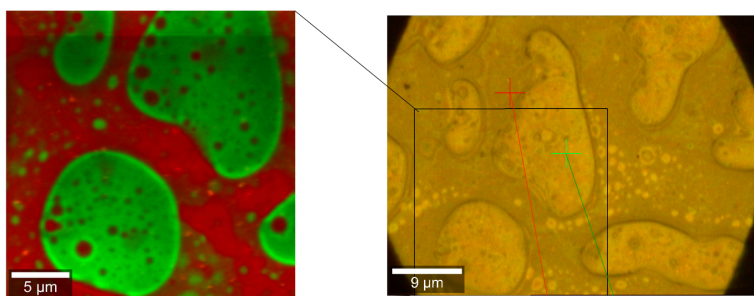
Experiencias

WITec alpha300RA

Mayo de 2019

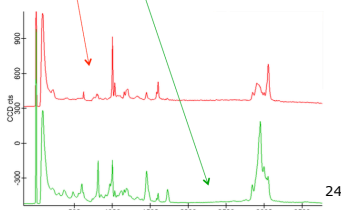
23

Ejemplo 1: Blend PMMA+PS



Mezcla de Poliestireno (PS) con polimetilmetacrilato (PMMA). Se identifican dos zonas (roja y verde), se obtiene un espectro raman en ambos lugares. El espectro indica que la zona marcada en verde es PMMA y la roja PS

Observando las diferencias en el mapping correspondiente al recuadro negro, donde se obtiene la imagen combinada de ambos componentes.

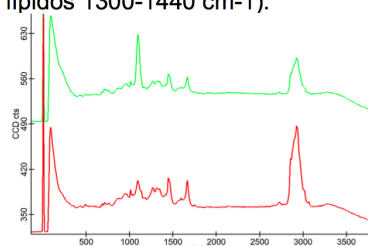


Mayo de 2019

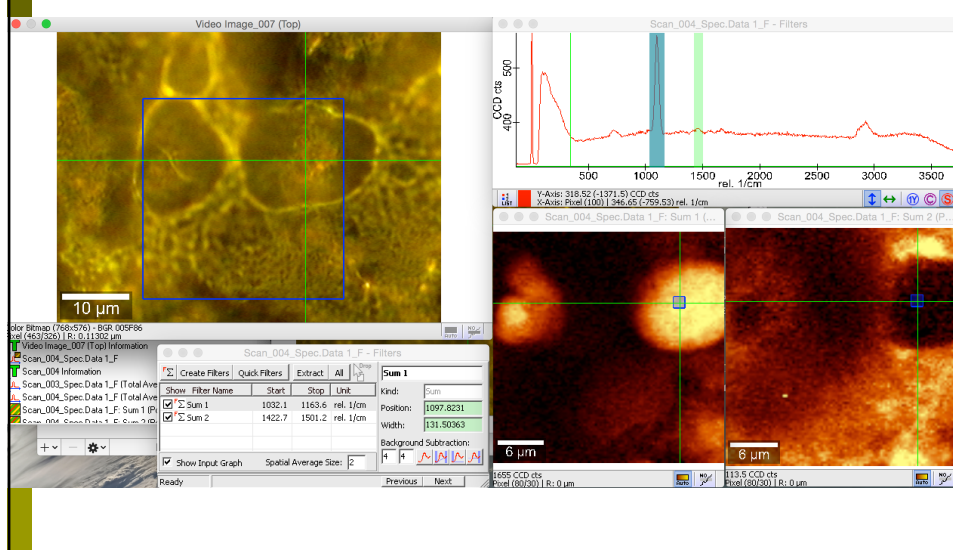
24

Ejemplo 2: Mesocestoides vogae larva tetrathyridea

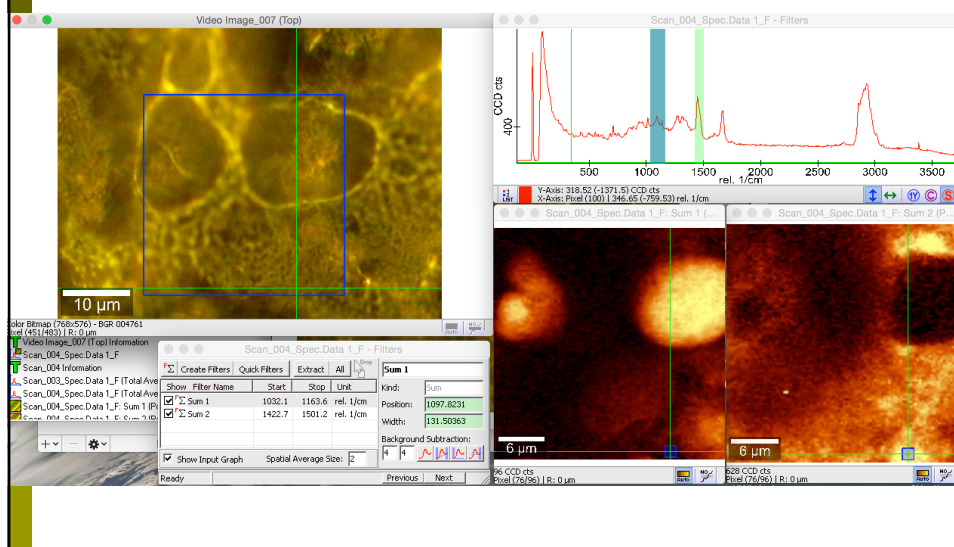
Identificación monohidrocalcita (verde) en *Mesocestoides vogae* (Lab. Farmacología/LEA Fac. de Química), gracias a la presencia de la banda ubicada a 1100 cm^{-1} , notar la imagen con contraste (verde). Por otra parte, las bandas restantes permiten identificar diferentes regiones de la membrana (bandas C-H $2700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, proteínas $1660\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$, lípidos $1300\text{--}1440\text{ cm}^{-1}$).



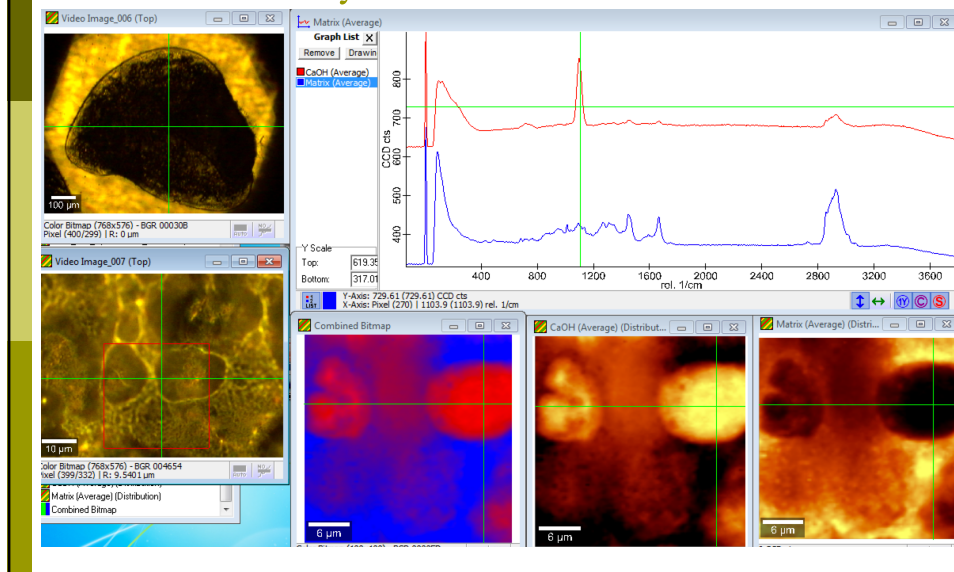
Ejemplo 2: Mesocestoides vogae larva tetrathyridea



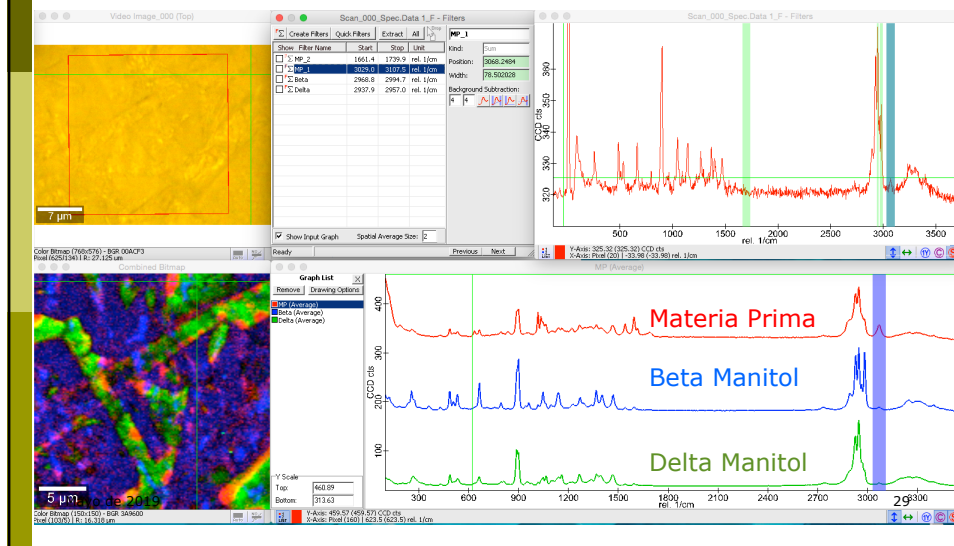
Ejemplo 2: Mesocestoides vogae larva tetrathyridea



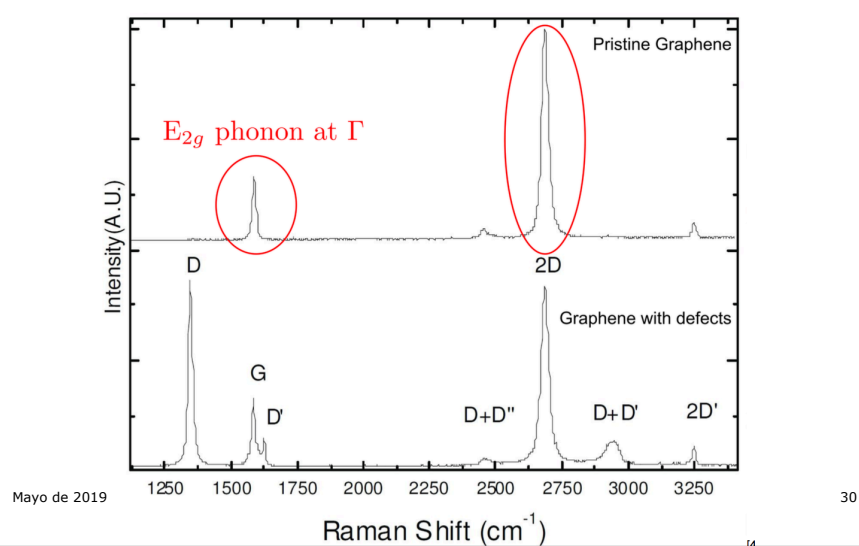
Ejemplo 2: Mesocestoides vogae larva tetrathyridea



Ejemplo 3: Formulaciones: Mannitol+ API



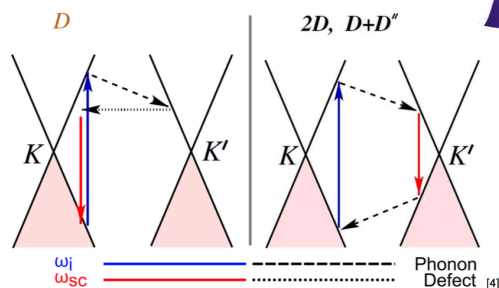
Ejemplo 4: Grafeno



Mayo de 2019

30

Ejemplo 4: Grafeno



D

- Intervalley scattering with TO phonon at K-point, $\vec{q}_{ph} \neq 0$
- D peak requires defect scattering to conserve momentum

Mayo et al.

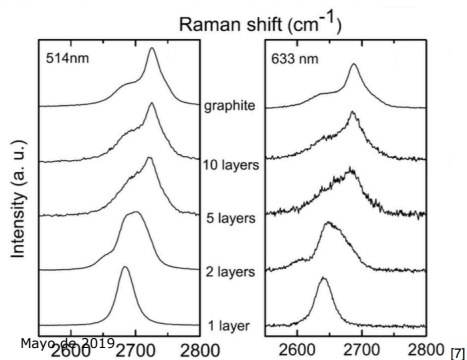
2D

- Double-resonant, intervalley scattering^[5] requires no defects
- Strong e⁻-ph coupling: 2D peak is more intense than G

31

Ejemplo 4: Grafeno

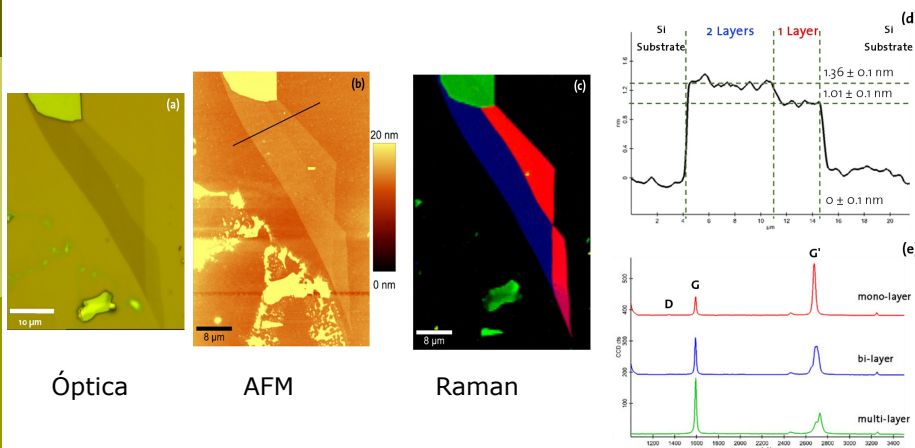
"Position and fwhm of the G and 2D peak(...)confirm presence of single-layer graphene"



- Position of 2D peak depends on number of layers
- Additional layers increase FWHM of 2D peak (more e⁻ states for resonant scattering)
- Occurrence of peaks at 1350 cm⁻¹ (D) and 1620 cm⁻¹ (D') reveal defects of graphene sample

32

Ejemplo 4: Grafeno y MLG



Óptica

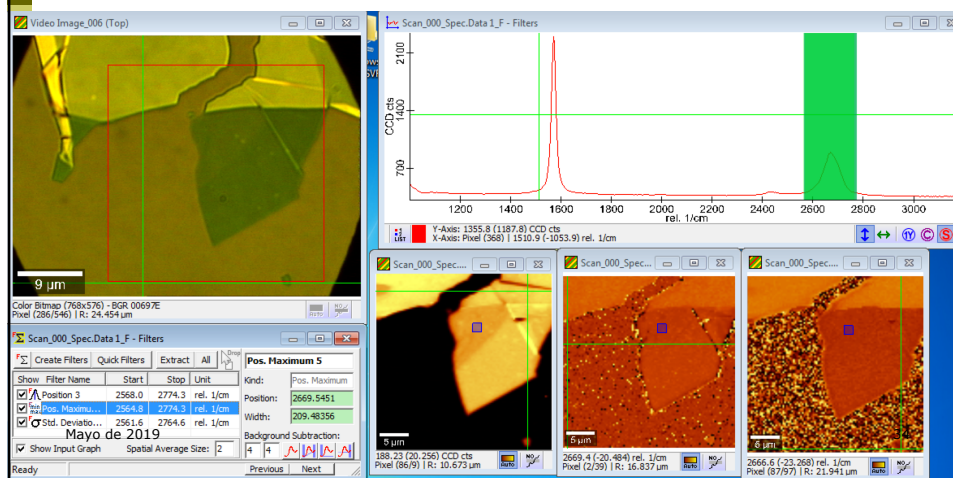
AFM

Raman

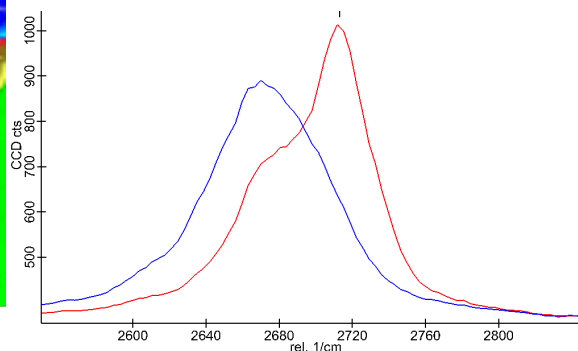
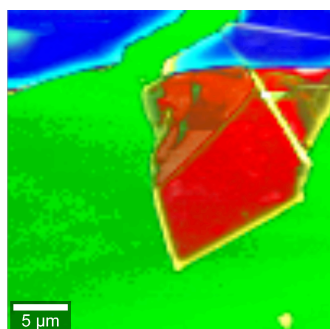
Mayo de 2019

33

Ejemplo 4: Grafeno



Ejemplo 4: Grafeno



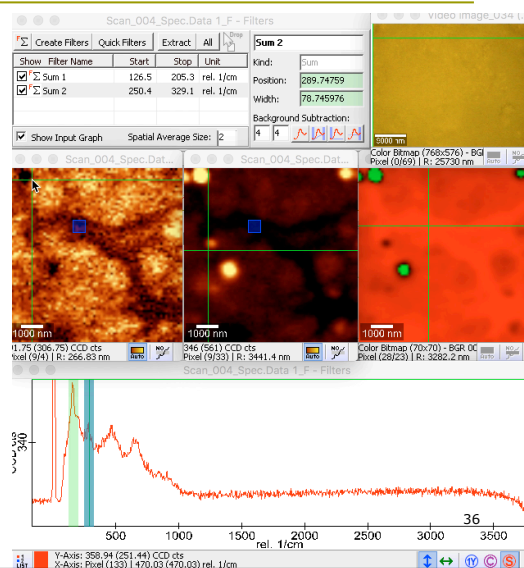
Mayo de 2019

35

Ejemplo 7: Caracterización de NT

Ejemplo de Funcionamiento:

- Muestra de NT calentados a $T=200^{\circ}\text{C}$.
- Presencia de Nanopartículas de Anatasa en muestra de NT.

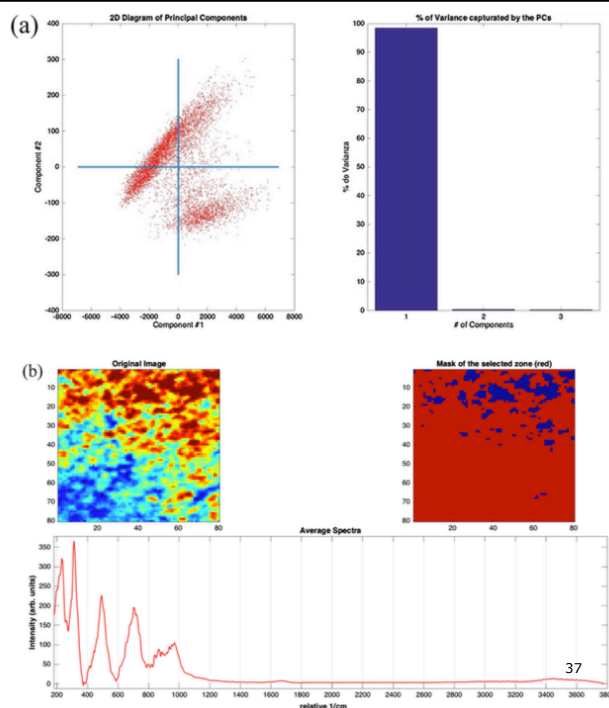


Mayo de 2019

36

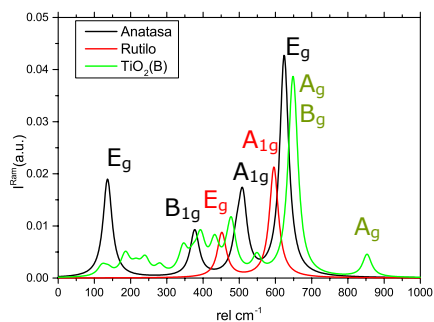
PCA para los fotoelectrodos de HTNT

Mayo de 2019



Modelado: Espectros Raman de polimorfos de TiO_2

Espectros Raman Calculados



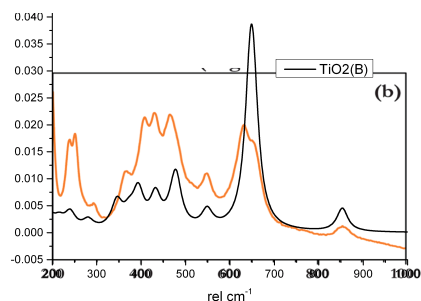
Mayo de 2019

Cálculos DFT: Código VASP

Ecut=400 eV

Ondas Planas

DFPT fonones



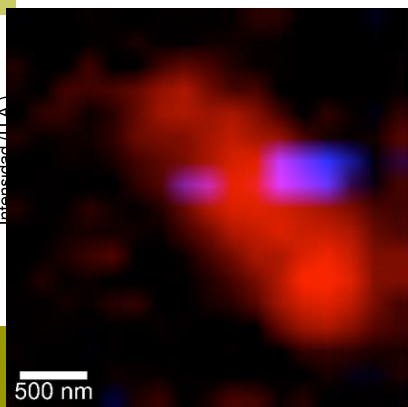
Espectros Raman Calculados y Experimental: 38
Dylla et al, J. Phys. Chem. Lett. 2012, 3, 2015 2019

Ejemplo 8: Interacción de Bacterias con Ag-NP

Evaluación de la Interacción PchNPs-Microorganismo.

Escherichia coli.

Microscopía Raman Confocal



Corrimiento Raman (cm ⁻¹) (±4cm ⁻¹)	Asignación de bandas	Comparación con células tratadas con PchNPs
624	Ácidos nucleicos	Disminuye
810	Aminoácidos	Disminuye
982	Polisacáridos	Igual
1186	Polisacáridos	Disminuye
1243	Polisacáridos	Disminuye
1308	Aminoácidos o ácidos nucleicos	Disminuye
1344	Aminoácidos o ácidos grasos	Igual
1593	Ácidos grasos	Disminuye

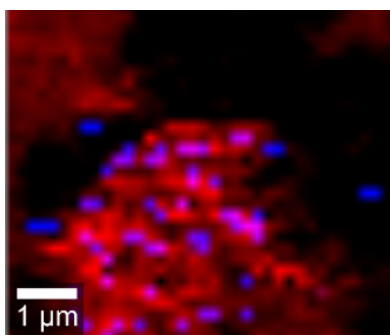
Asignación según De Gelder et al., *J Raman Spectroscopy*, 2007, 38(9), 1133-1147

Ejemplo 8: Interacción de Bacterias con Ag-NP

Evaluación de la Interacción PchNPs-Microorganismo.

Staphylococcus aureus.

Microscopía Raman Confocal



Corrimiento Raman (cm ⁻¹) (±4cm ⁻¹)	Asignación de bandas	Comparación con células tratadas con PchNps
663	Ácidos nucleicos	Disminuye
790	Aminoácidos	Disminuye
879	Aminoácidos	Disminuye
929	Polisacáridos	Disminuye
1116	Polisacáridos	Disminuye
1325	Aminoácidos o ácidos nucleicos	Disminuye
1538	Ácidos grasos	Disminuye

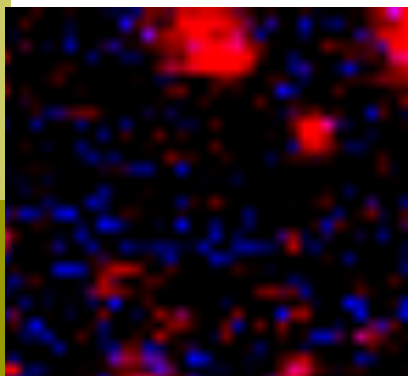
40

Asignación según De Gelder et al., *J Raman Spectroscopy*, 2007, 38(9), 1133-1147

Ejemplo 8: Interacción de Bacterias con Ag-NP

Evaluación de la Interacción PchNPs-Microorganismo. ***Candida albicans***.

Microscopía Raman Confocal



Corrimiento Raman (cm ⁻¹) (±4cm ⁻¹)	Asignación de bandas	Comparación con células tratadas con PchNps
670	Ácidos nucleicos	Disminuye
788	Aminoácidos	Disminuye
885	Aminoácidos	Disminuye
999	Polisacáridos	Disminuye
1100	Polisacáridos	Disminuye
1319	Aminoácidos o ácidos nucleicos	Disminuye
1596	Ácidos grasos	Disminuye

41

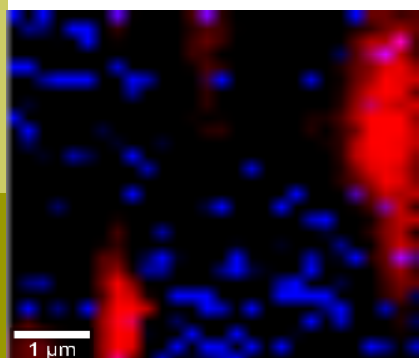
Asignación según De Gelder et al., *J Raman Spectroscopy*, 2007, 38(9), 1133-1147

Ejemplo 8: Interacción de Bacterias con Ag-NP

Evaluación de la Interacción PeNPs-Microorganismo.

Escherichia coli.

Microscopía Raman Confocal



Corrimiento Raman (cm ⁻¹) (±4cm ⁻¹)	Asignación de bandas	Comparación con células tratadas con PeNp
624	Ácidos nucleicos	Desaparece
810	Aminoácidos	Disminuye
982	Polisacáridos	Aumenta
1186	Polisacáridos	Desaparece
1308	Aminoácidos o ácidos nucleicos	Aumenta

42

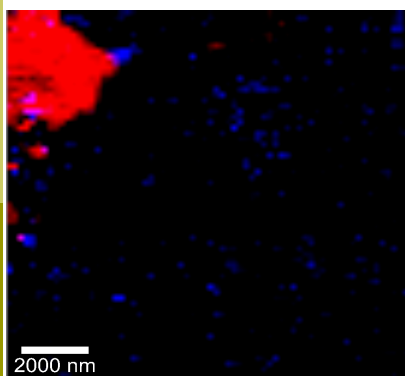
Asignación según De Gelder et al., *J Raman Spectroscopy*, 2007, 38(9), 1133-1147

Ejemplo 8: Interacción de Bacterias con Ag-NP

Evaluación de la Interacción PeNPs-Microorganismo.

Staphylococcus aureus.

Microscopía Raman Confocal



Corrimiento Raman (cm ⁻¹) (±4cm ⁻¹)	Asignación de bandas	Comparación con células tratadas con PeNp
993	Polisacáridos	Disminuye
1092	Polisacáridos	Disminuye
1327	Aminoácidos o ácidos nucleicos	Disminuye
1587	Ácidos grasos	Disminuye

43

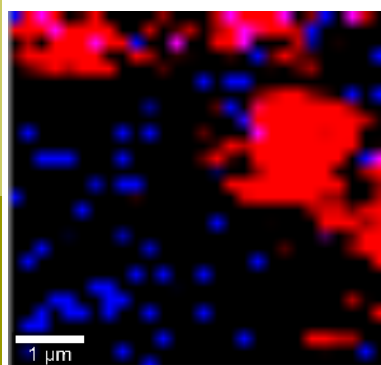
Asignación según De Gelder et al., *J Raman Spectroscopy*, 2007, 38(9), 1133-1147

Ejemplo 8: Interacción de Bacterias con Ag-NP

Evaluación de la Interacción PeNPs-Microorganismo. ***Candida***

albicans.

Microscopía Raman Confocal



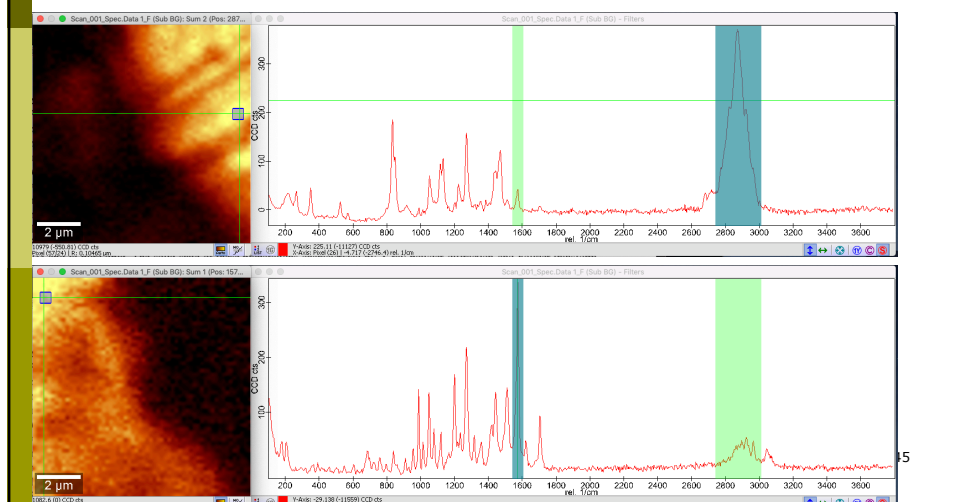
Corrimiento Raman (cm ⁻¹) (±4cm ⁻¹)	Asignación de bandas	Comparación con células tratadas con PeNp
698	Ácidos nucleicos	Disminuye
750	Aminoácidos	Disminuye
991	Polisacáridos	Igual
1318	Aminoácidos o ácidos nucleicos	Igual
1597	Ácidos grasos	Disminuye

44

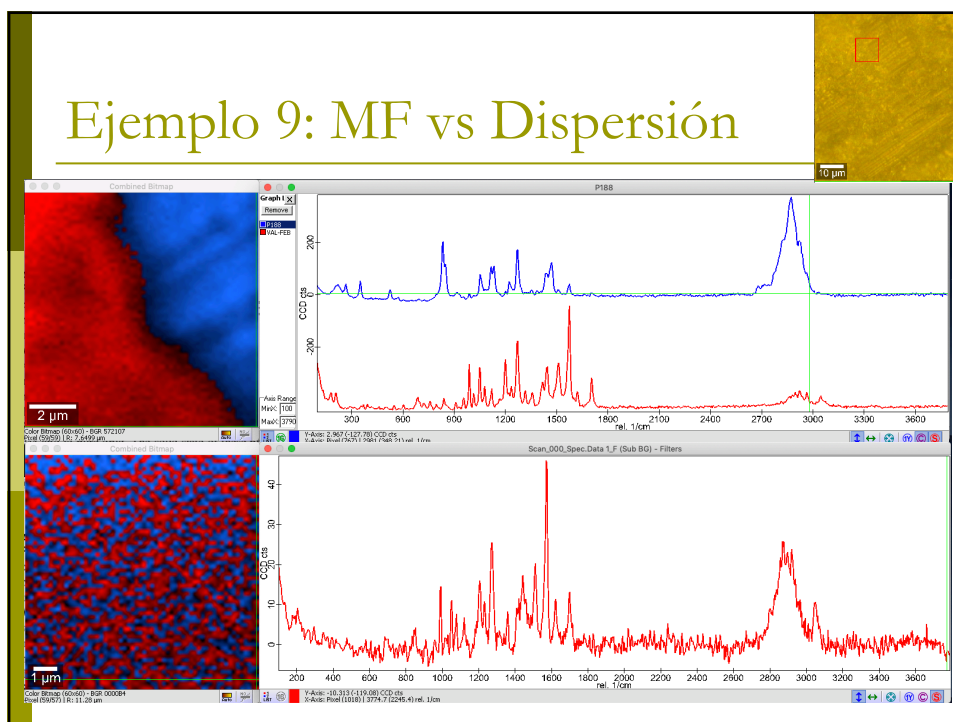
Asignación según De Gelder et al., *J Raman Spectroscopy*, 2007, 38(9), 1133-1147

Ejemplo 9: Formulaciones Farmacéuticas

Val-Feb Mezcla Física con P188



Ejemplo 9: MF vs Dispersión



Ejemplo 9: MF vs Dispersiones

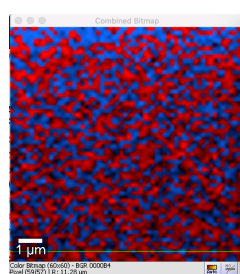
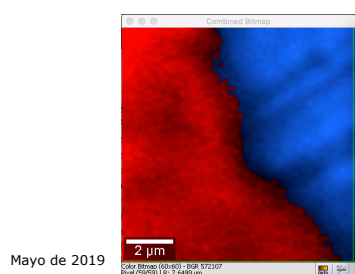
Journal of Pharmaceutical Innovation
<https://doi.org/10.1007/s12247-017-9306-9>

ORIGINAL ARTICLE



The Impact of Solid Dispersion on Formulation, Using Confocal Micro Raman Spectroscopy as Tool to Probe Distribution of Components

M. Elisa Melian¹ · A. Beatriz Munguía¹ · Ricardo Faccio² · Santiago Palma³ · Laura Domínguez¹



47

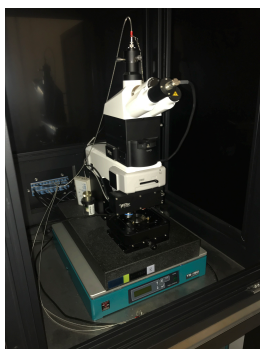
Resumen: Micro Raman Confocal

- ❑ No Destructivo
- ❑ Identificación Química Directa
- ❑ Identificación de Propiedades de Materiales
- ❑ Preparación sencilla de muestra
- ❑ Sólidos y Líquidos
- ❑ Detección 3-dimensional
- ❑ Combinación de detección química con AF

Mayo de 2019

48

Microscopía de Fuerza Atómica

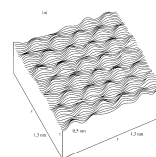
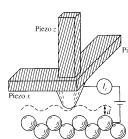


Mayo de 2019

49

1. Introducción

□ Historia



Microscopio de efecto túnel (STM)
Microscopio de fuerza atómica (AFM)

Premio Nobel Física 1986



G. Binnig



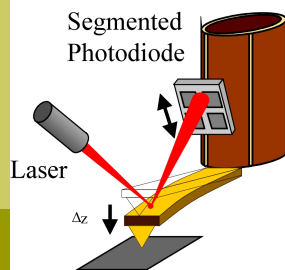
H. Rohrer

Mayo de 2019

50

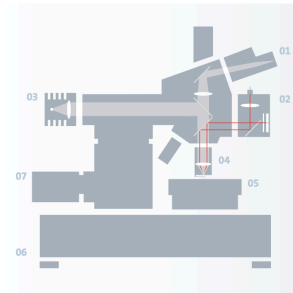
1. Introducción

Esquema

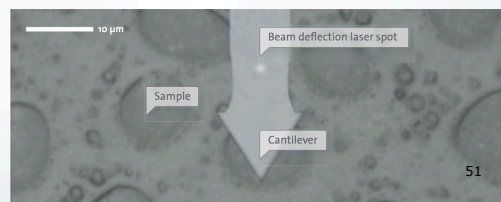


Mayo de 2019

- BEAM PATH**
- 01 Video camera system
 - 02 Beam deflection unit
 - 03 LED white light illumination
 - 04 AFM objective with cantilever
 - 05 Scan-stage
 - 06 Active vibration-isolation table
 - 07 Z-stage for focusing



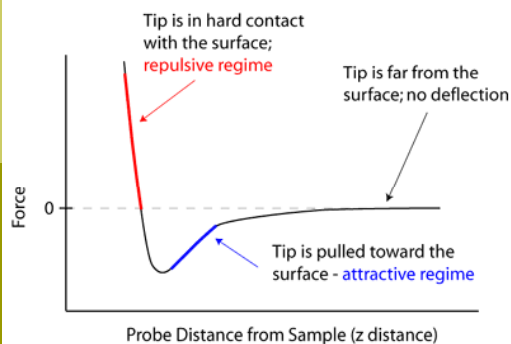
SIMULTANEOUS CANTILEVER AND SAMPLE VIEW



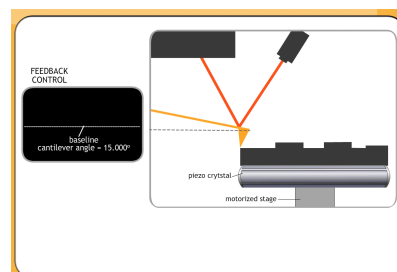
51

2. Modo Contacto

- Topografía
- Afectada por la respuesta mecánica del material
- Permite distinguir zonas con diferente comportamiento mecánico



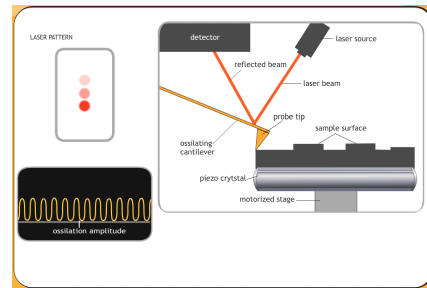
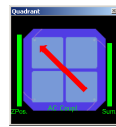
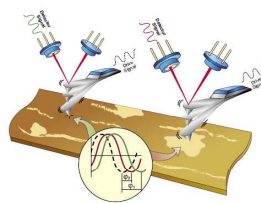
Mayo de 2019



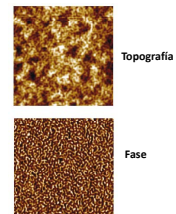
52

3. Modo No Contacto e Intermitente

- Contacto Intermitente (Force Modulation):
 - El cantilever oscila, interaccionando con la muestra
- No Contacto
 - El cantilever oscila, sin Interacción con la Muestra

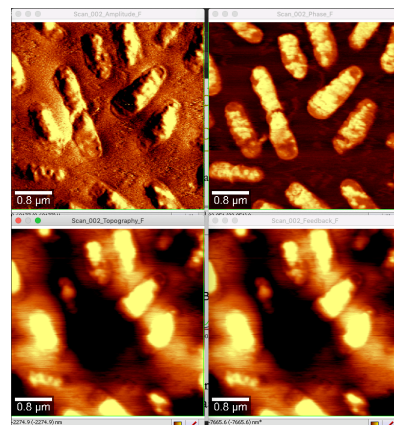


Mayo de 2019



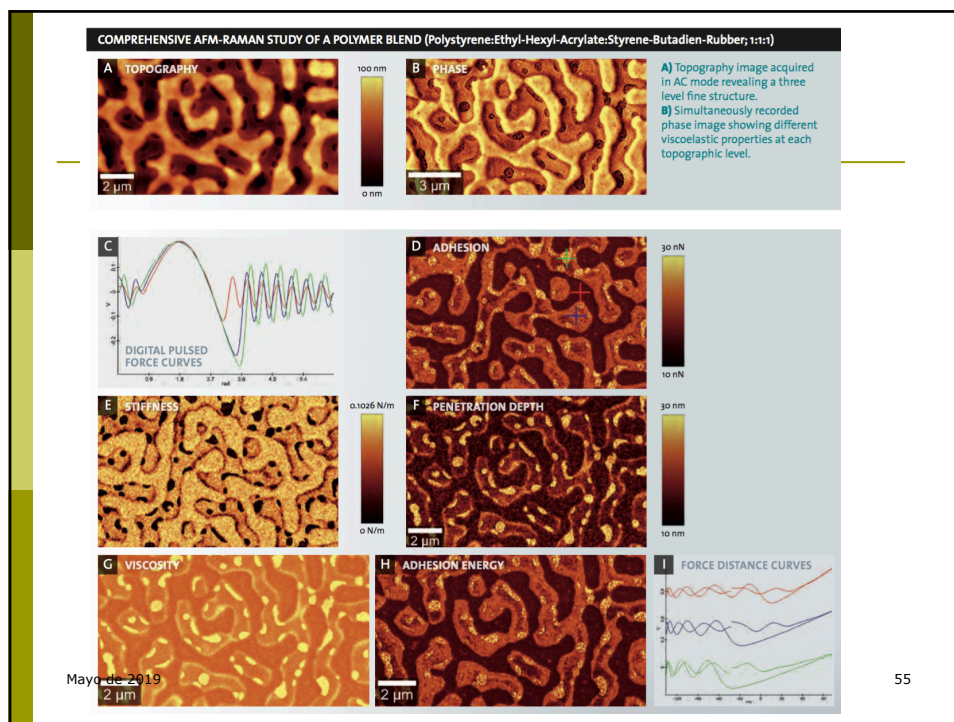
3. Modo No Contacto e Intermitente

- Elección del Cantilever:
 - Tapping Mode (Force Modulation):
 - Resonancia: 65-85 kHz
 - Constante $k=2.8 \text{ Nm}^{-1}$
 - Algo de Interacción con la muestra
 - Modo No Contacto
 - Resonancia: 230-300 kHz
 - Constante $k=42 \text{ Nm}^{-1}$
 - Muestras muy "blandas"
 - (ej.: Polímeros, geles, microorganismos, etc). El Objetivo es la Phase Contrast image.
 - Imágenes de Fase:
 - Propiedades Viscoelásticas.
 - Potencial de Adhesión.



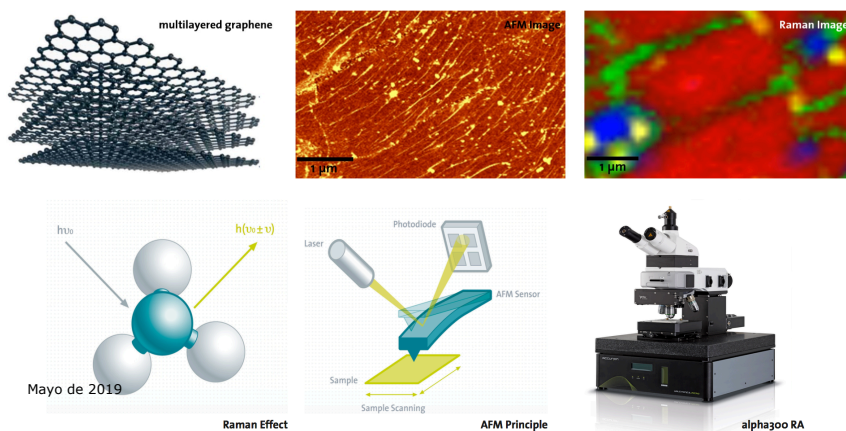
Mayo de 2019

54



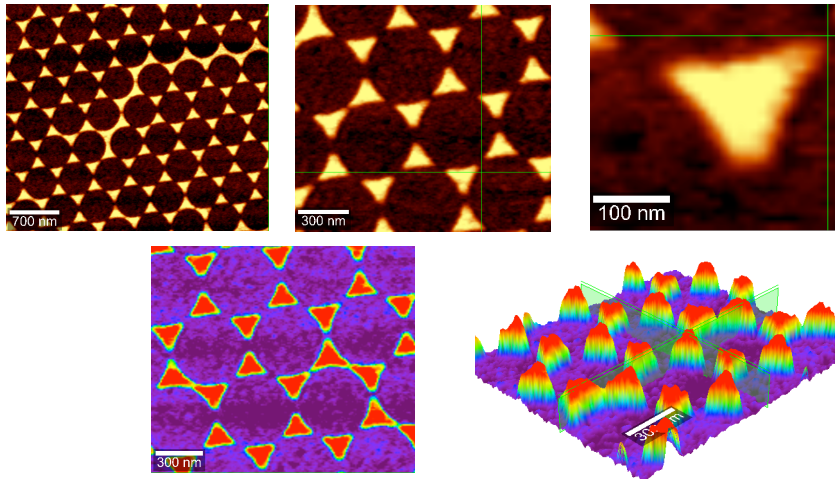
Micro Raman AFM Dual

- ▣ Alpha 300R → Alpha 300RA
- FSE_1_2014_1_102008 - ANII



4. Ejemplos:

Contact mode: Triángulos de Al

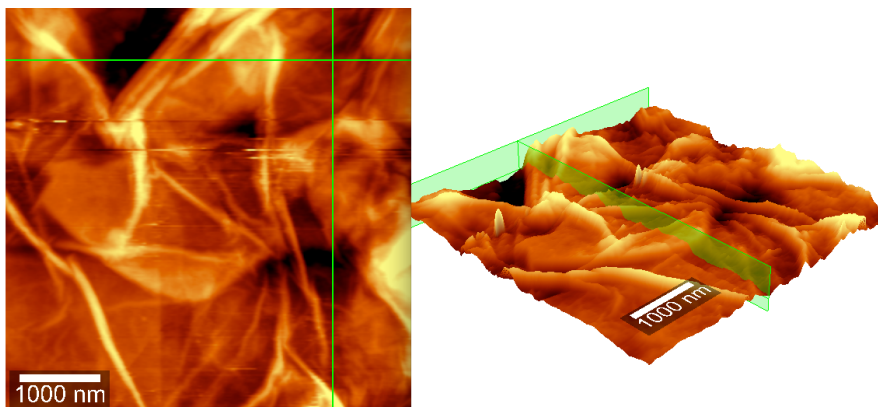


Mayo de 2019

57

4. Ejemplos: Modo No Contacto

▣ Reduced Graphene Oxide

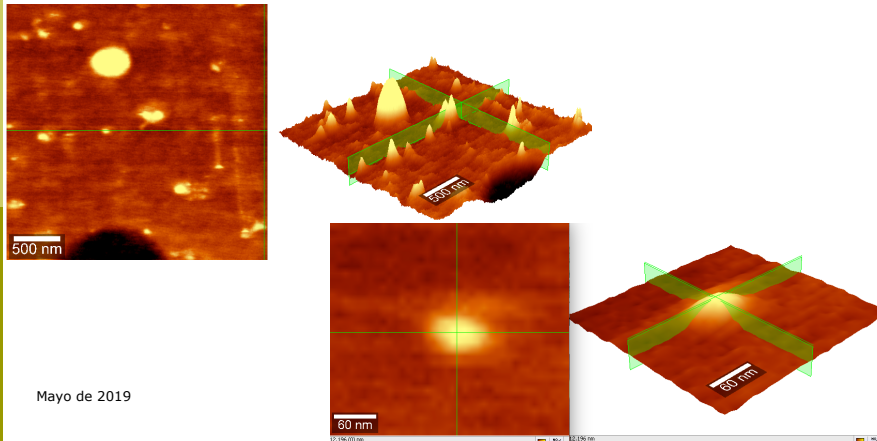


Mayo de 2019

58

4. Ejemplos: Modo No Contacto

- GOQD sobre sustrato de silicio
- 60 nm de diámetro y 13 nm de alto

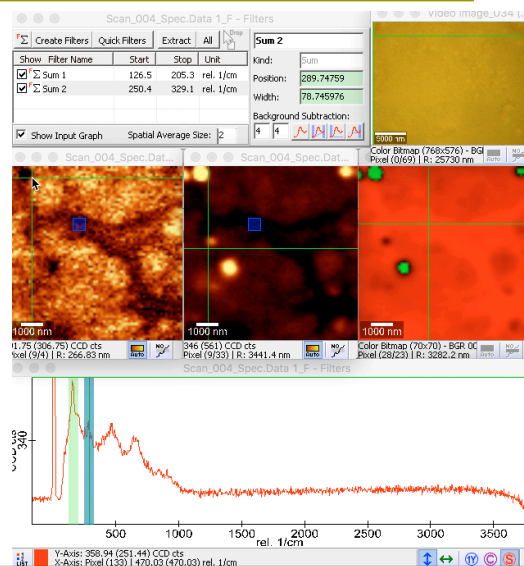


4. Ejemplos: Caracterización de NT: Microscopia Raman

- Muestra de NT calentados hasta $T=200^{\circ}\text{C}$.
- Crecimiento de Nanopartículas de Anatasa en muestra de TNT.

Funcionamiento:

- Cada pixel de la imagen contiene un espectro Raman, constituyendo una técnica hyper-espectral.
- Con esta información es posible reconstruir todo tipo de imágenes, por ejemplo siguiendo la intensidad de una determinada banda Raman



4. Ejemplos: AFM

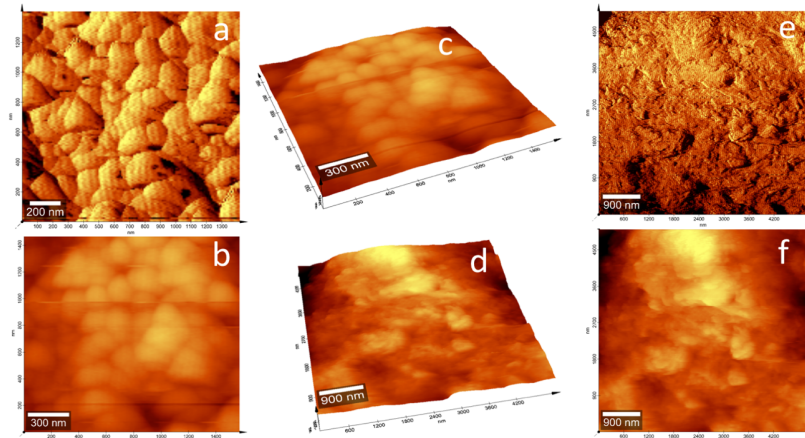
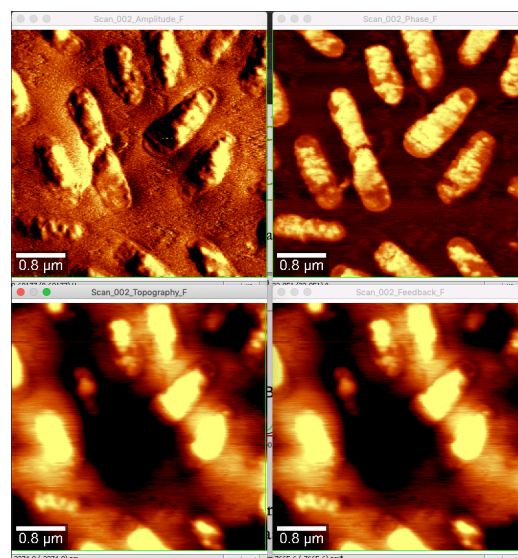


Figure 3.- AFM images for the anatase photoelectrode: (a) contrast phase, (b) topography and (c) 3D-topography images. Idem for HTNT photoelectrode: (d) 3D-topography (e) phase contrast and (f) topography images.

4. Ejemplos: Bacterias con Ag-NP

□ NC AFM

- Amplitud
- Fase
- Topografía
- Feedback



Mayo de 2019

Resumen: AFM/EFM/MFM

- Diferentes Modos de Medida:
 - *Contacto*
 - *No Contacto e Intermittente (Tapping)*
 - *Liftmode*
- AFM/EFM/MFM
- Topología y Propiedades Físicas:
 - *Dureza*
 - *Viscosidad*
 - *Adhesión*
- Posibilidad de medir en Líquidos

Mayo de 2019

63

Agradecimientos



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN

- Parque Científico y Tecnológico de Pando (PCTP) / Instituto Polo Tecnológico de Pando
- ANII- Proyecto EQC_X_2012_1_14.
- ANII-FSE_1_2014_1_102008 Fondo Sectorial de Energía.
 - Grupo de Farmacología & LEA, CIENFAR - FQ
 - Microbiología-Biotecnología, DEPBIO – FQ.
 - Instituto Nacional de Donación y Trasplante - INDT
 - Grupo Física del Estado Sólido– IF-FING
 - Cátedra de Química Inorgánica –FQ
 - Cátedra de Análisis Instrumental – FQ
 - Cátedra de Fisicoquímica -FQ
 - Laboratorio de Biomateriales – FCIEN



Mayo de 2019

64

Difracción de Rayos X

□ Rigaku Ultima IV

□ Geometría Para focalizante Bragg-Brentano



□ Geometría Haz paralelo, Cross-Beam-Optics CBO

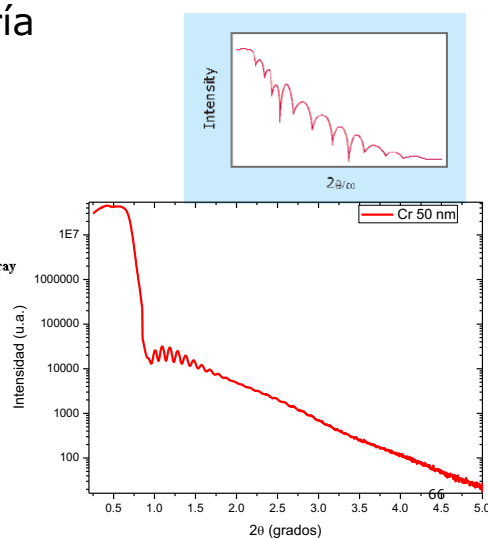
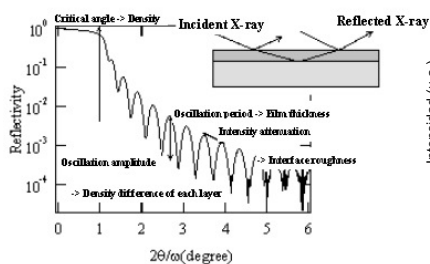
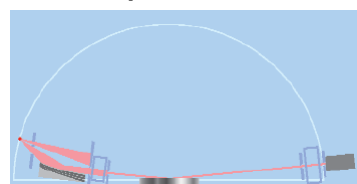


Mayo de 2019

65

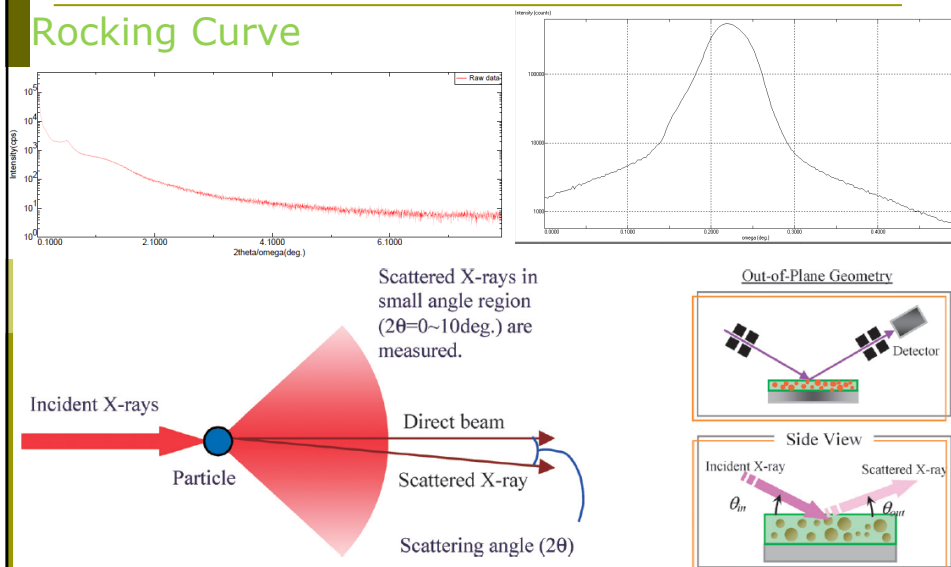
Difracción de Rayos X

□ X-Ray Reflectometría



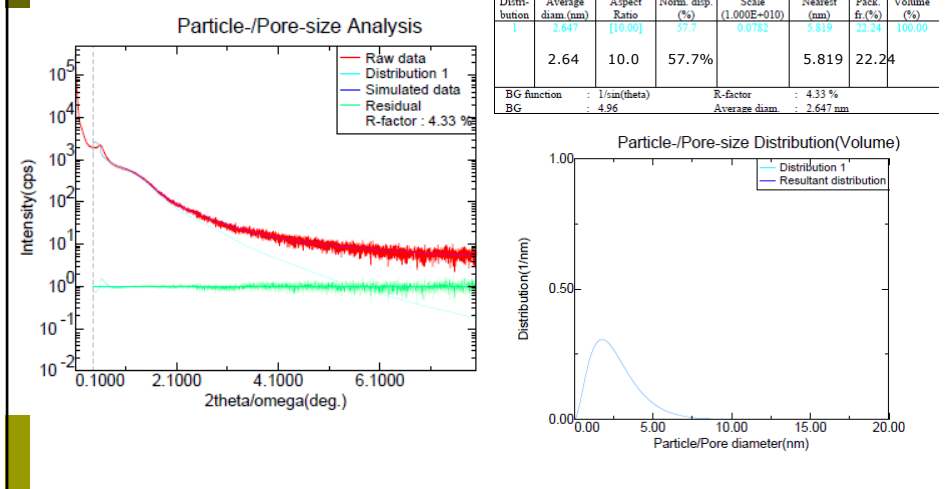
Difracción de Rayos X

Rocking Curve



Difracción de Rayos X

SAXS reflectometria





U D E L A R
FACULTAD DE QUÍMICA



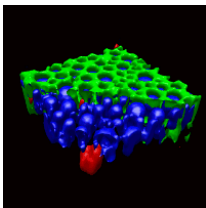


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Gracias



Nano Mat





PCTP
Parque Científico
Tecnológico de Pando



polo tecnológico
química - biotecnología

Mayo de 2019

rfaccio@fq.edu.uy

69