

*Mina Hong, Gerald Pascual, Byong Kim, and Keibock Lee  
Park Systems, Inc., Santa Clara, USA*

# Proyección topográfica de diversas muestras orgánicas sumergidas en una solución electrolítica mediante el uso del microscopio Park NX10 mediante Scanning Ion Conductance Microscopy

## Introducción

Para poder identificar y entender la principal causa de un problema y a partir de ello generar una solución, muchas veces es necesario analizar la muestra *In-situ*. Muchas de las aplicaciones innovadoras tienen esta necesidad, aplicaciones como: 1) el estudio de fallo de mecanismos en electrodos de batería, 2) el estudio del transporte de iones entre células, y 3) el estudio de biomecánica estática y dinámica a nivel celular. La necesidad común de todas estas aplicaciones es la de obtener las medidas reales de una muestra que está bajo la influencia de algún fenómeno, mientras está en una solución electrolítica. Técnicas como la del Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) han sido utilizadas para proyecciones de muestras en líquido, pero la realidad es que un microscopio AFM no puede ser considerado como herramienta ideal para este tipo de mediciones. Las muestras orgánicas en particular tienden a ablandarse e hincharse cuando se sumergen en líquido, haciéndolas más susceptibles a posibles daños causados por la punta del AFM. Además de esto, aún el movimiento más suave de la sonda del AFM, puede causar que la muestra resbale y cambie de posición durante el escaneo. Las técnicas de escaneo de este tipo de muestras, que requieren contacto directo entre la sonda y la muestra, no son las

más apropiadas. Afortunadamente, este problema ha sido resuelto mediante el desarrollo del Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) junto a un nuevo instrumento: el microscópico Park NX10 SICM. En el SICM, la topografía de la muestra es obtenida por medio de la regulación del flujo de corriente iónica que pasa a través de la apertura de una pipeta de vidrio mientras que ésta se mueve a lo largo de la superficie de la muestra, todo esto ocurre mientras se tiene la muestra sumergida en una solución electrolítica. Este mecanismo es completamente no-invasivo, ya que no se aplica ningún tipo de presión a la muestra. Gracias a este sistema, se han superado las limitaciones que tenían los microscopios AFM con las muestras delicadas y húmedas, evitando también la posibilidad de accidentalmente mover la muestra sumergida en líquido.

## Experimentos

El microscopio Park NX10 SICM está basado en la plataforma del microscopio Park NX10 AFM. El hardware es el mismo, con la diferencia del cabezal SICM en lugar del cabezal AFM estándar. En vez de usar una punta de AFM para proyectar la topografía de la muestra midiendo la interacción de fuerza entre la punta y la muestra, el cabezal SICM usa o bien una pipeta de vidrio de diámetro interno de 80-100 nm o una pipeta de cuarzo con un diámetro interno de 30-50 nm. La pipeta es llenada con una solución electrolítica, y conectada a un electrodo de Ag/AgCl mientras que otro electrodo es conectado a la muestra en líquido (Figura 1 a). Esto forma un circuito cerrado, y con un determinado voltaje aplicado entre los dos electrodos, la corriente iónica fluye desde la pipeta hacia la muestra (Figura 1 b). Cuando la pipeta se acerca a la muestra, la corriente decrece. Esta relación entre la corriente y el desplazamiento es medido y grabado mediante el rápido y preciso ciclo de retroalimentación del sistema. Cuando la pipeta llega a tocar la superficie de la muestra, la corriente bajará a cero. El grado de decrecimiento de la corriente, es usado para calcular la topografía de la muestra. La pipeta escanea la superficie a un determinado nivel de corriente (99% normalmente), lo cual significa que siempre se mantiene a unos cientos nanómetros lejos de la superficie. Bastante similar al Microscopio de Efecto Túnel (STM), el cual toma la corriente de tunelamiento para poder obtener las características de la superficie de un material, el SICM hace seguimiento de las variaciones de corriente para proveer una proyección sin contacto alguno y sin aplicar fuerza. A esto se le añade la ventaja de no tener que ajustar el cantiléver, lo cual puede añadir complejidad a la proyección en líquido sin contacto. Esta técnica no solo provee imágenes notablemente estables y datos cuantitativos, sino que también hace posible la observación a nanoescala de materiales biológicos ultra delicados y sensibles, como por ejemplo células vivas.

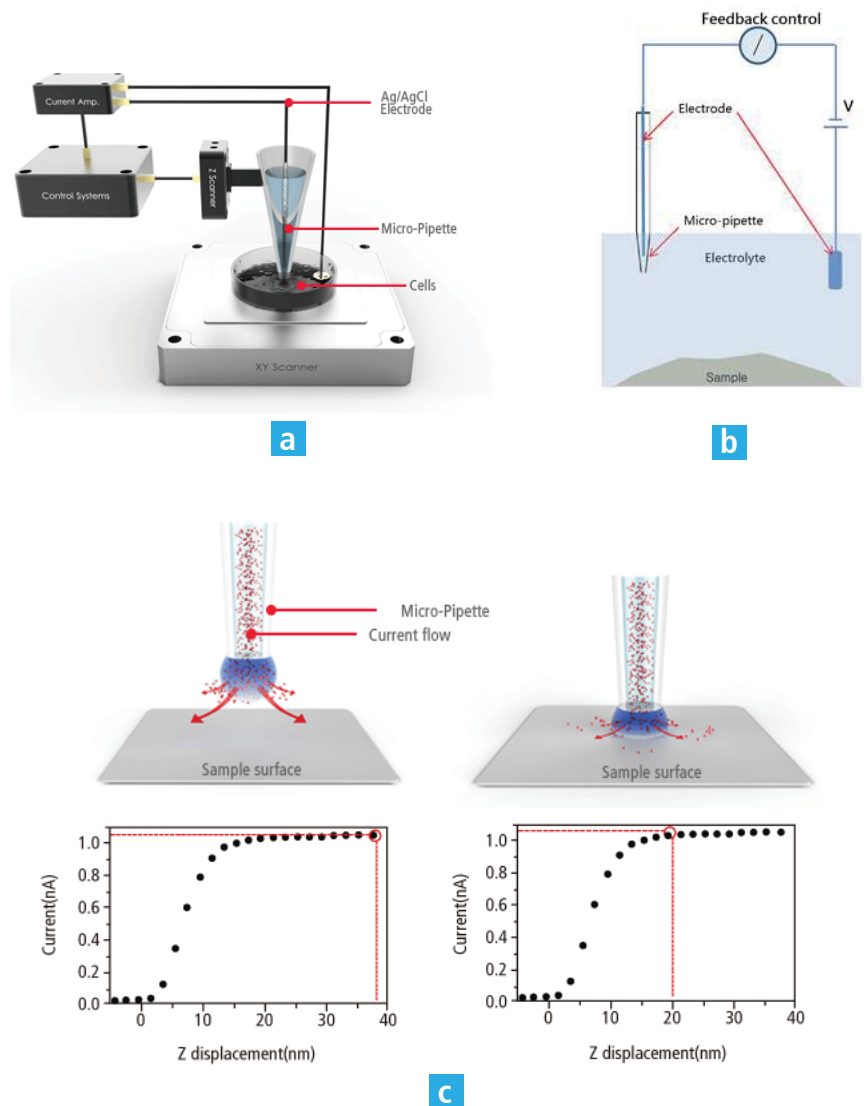


Figura 1. Las imágenes muestran (a) Configuración hardware del SICM, (b) mecanismo del circuito y (c) relación de corriente-distancia entre la terminación de la pipeta y la superficie de la muestra.

Hay dos tipos de modo de proyección en el microscopio SICM. El primero es el modo de escaneo por acercamiento-retroceso (ARS). Este modo es muy aplicado para muestras con variaciones de superficie mayor a 1  $\mu\text{m}$ . Debido a la alta variación de altura, la pipeta se rompería fácilmente si es usada con escaneo continuo. Es por ello que en el modo ARS, la pipeta se acerca a la muestra hasta alcanzar un determinado punto y luego retrocede completamente hasta la posición inicial, todo esto antes de escanear el siguiente píxel de la imagen. El proceso de acercamiento y retroceso se repite en cada píxel de la imagen hasta haber completado todo el escaneo. El segundo modo es el modo de Corriente Directa (DC). Este modo es principalmente para muestras con variaciones de altura menores a los cien nanómetros. La pipeta continuamente escanea la superficie a un determinado nivel de corriente, lo cual significa que la distancia entre la pipeta y la superficie de la muestra está ajustada.

## Resultados y discusiones

Para poder mostrar el fácil uso y la gran precisión del microscopio SICM, elegimos tres muestras representativas; polidimetilsiloxano (PDMS), una membrana de policarbonato con poros de 400 nm, y fibras de colágeno. Los modos DC o ARS fueron elegidos de acuerdo a las propiedades de los materiales. Polidimetilsiloxano (PDMS): El PDMS fue elegido para proyección primeramente porque es un material usado para crear estándares en el sistema de calibración SICM. Dicho eso, cabe notar que el PDMS también es usado en los lentes de contacto. Al hacer investigaciones del PDMS en condiciones reales de uso, se llega a obtener una visión más profunda de cómo actúa realmente este material cuando está en un ambiente de aplicación práctica. En el caso de los lentes de contacto, el ambiente de aplicación práctica sería el ojo humano, el cual es humectado de forma regular mediante la secreción de lágrimas, un lubricante biológico que contiene electrolitos. Se proyectaron dos muestras estándares PDMS con diferentes geometrías, proveídas por Park Systems. Una de ellas es una malla cuadriculada XY con tamaño de campo de  $10\mu\text{m}$ , y otra, una malla en forma de barras con  $117.5\text{ nm}$  de altura. Se usó como solución electrolítica una solución estándar salina tamponada con fosfato (PBS) proveída por Thermo Fisher Scientific.

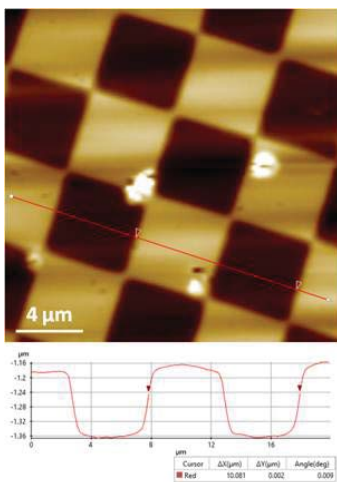


Figura 2. Imagen topográfica de la muestra estándar XY obtenida por el modo DC. Tamaño de escaneo  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ . Tamaño de la imagen:  $215\text{ px} \times 215\text{ px}$ .

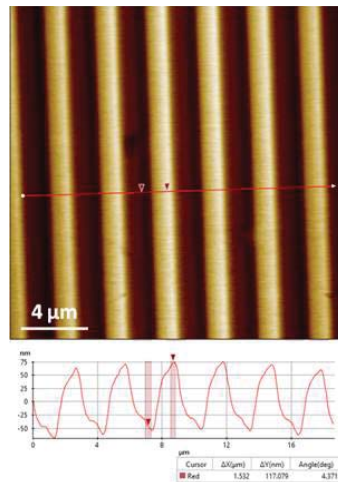


Figura 3. Imagen topográfica de la muestra estándar Z obtenida por el modo DC. Tamaño de escaneo  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ . Tamaño de proyección:  $256\text{ px} \times 256\text{ px}$ .

Las figuras 2 y 3 muestran las imágenes topográficas adquiridas en modo DC de los estándares XY y Z respectivamente. Estas proyecciones muestran de forma satisfactoria las características de la superficie de forma no ambigua y con alto contraste. Se utilizó el software de procesamiento de imagen XEI de Park Systems para hacer el procesamiento de imagen, incluyendo el análisis cuantitativo. Para la muestra estándar XY, la distancia de  $10\mu\text{m}$  extremo a extremo y los  $\sim 160\text{ nm}$  de altura son revelados de forma precisa (Figura 2). Para la muestra estándar Z, la información de altura dada por el modo DC, es bastante cerca al valor deseado de los  $117.5\text{ nm}$ .

Membrana de policarbonato: Los nano-poros hacen referencia a hoyos con tamaños de decenas a miles de nanómetros, poros que se encuentran en delgadas membranas. Debido a la penetración de moléculas o proteínas en los poros, las membranas pueden ser poderosos sensores de moléculas y iones; esta propiedad es aplicada en diversos campos, incluyendo la ingeniería, química, biología, medicina, entre otros. Los avances recientes en la nanotecnología hacen posible el control preciso de la morfología, de las propiedades físicas y químicas de los poros, con el fin de hacerlos muchos más atractivos para la regulación y transporte a nivel molecular [1]. También, con cierto nivel de modificación química, las membranas con nano poros pueden ser usadas para mayor efectividad en separación o filtración de nano partículas [2, 3]. También se llevó a cabo una extensa investigación sobre la fabricación, caracterización, y modelado de membranas con nano poros. El microscopio AFM tradicional suele basarse en la interacción de fuerzas entre la punta de la sonda y la superficie de la muestra. Sin embargo, esto no es suficiente para comprobar la aguda geometría de la superficie de una membrana, ni tampoco para medir la transportación iónica que existe a través de sus poros. El microscopio SICM ha probado ser una técnica poderosa capaz de lograr ambas cosas [4, 5].

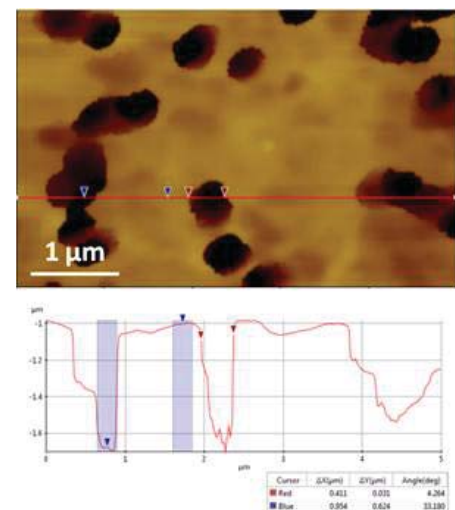


Figura 4. Imágenes topográficas de poros de membranas de policarbonato con  $400\text{ nm}$  de diámetro, obtenidas en solución PBS con el modo SICM ARS. El promedio de profundidad de poro es  $\sim 600\text{ nm}$ .

Pusimos a prueba la membrana de policarbonato con poros de  $400\text{ nm}$  proveída por "GE Water&Process Technologies", en solución PBS usando el microscopio SICM. La membrana se colocó en sustrato PDMS para proyección. Para evitar daños a la pipeta a causa de los poros profundos, solo utilizamos el modo ARS en esta muestra. La figura 4 muestra el tamaño de los poros adquiridos por el SICM. Los datos muestran que los poros tienen un diámetro promedio de aproximadamente  $416\text{ nm}$  y una profundidad promedio de  $600\text{ nm}$ . De hecho, se realizaron trabajos más avanzados con este tipo de

muestras; así como la identificación de actividad de transporte de los poros individualmente[4, 5].

**Fibras de colágeno:** Las fibras de colágeno son ampliamente aceptadas como muestras estándar para medición de propiedades de materiales biológicos y materiales delicados. Así como muchas muestras biológicas, estas fibras se suavizan e hinchan una vez hidratadas, pudiendo también deslizarse y moverse con el toque de una sonda AFM. Esta tercera muestra, proveída por nuestros colaboradores en la Universidad de Niigata en Japón, nos permite demostrar la capacidad del SICM para proyectar muestras cuyas topografías a nanoescala serían difíciles de obtener con otras técnicas microscópicas.

Las fibras de colágeno fueron cortadas y centrifugadas, con una solución PBS se obtuvieron imágenes en el microscopio Park NX10 SICM. Debido a la variación de altura de las fibras de colágeno, solo aplicamos en modo ARS. El software XEP fue usado para realizar todas las pruebas. Como se puede ver en la Figura 5, el conjunto de proteínas, así como cada una de las fibras, pueden ser claramente identificadas en las imágenes de 10  $\mu\text{m}$  de tamaño a una resolución de 256 x 256 píxeles. La fibra más delgada que el SICM puede distinguir (indicado con la flecha negra) es de solo 90 nm de ancho. Basado en el hecho de que no existe verdadero contacto ni fuerza entre la pipeta y la superficie de la muestra, esta resolución es bastante impresionante.

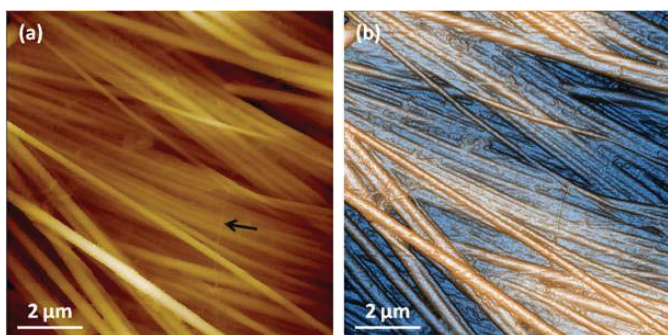


Figura 5. (a) Imágenes topográficas e (b) imágenes topográficas de alto contraste de la muestra de colágeno, proyectada en solución PBS con el modo SICM ARS. Las fibras individuales pueden ser claramente identificadas, siendo la fibra observada más delgada de aproximadamente 90 nm de ancho, señalada con la flecha negra. Tamaño de escaneo 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$ . Tamaño de imagen 256 px x 256 px

## Resumen

Las imágenes topográficas de las tres muestras fueron adquiridas de forma eficiente y precisa en una solución mediante el uso del microscopio Park NX10 SICM. Esta técnica innovadora resuelve por completo los problemas existentes en las investigaciones con microscopios tradicionales AFM en líquido y provee una solución sin necesidad de aplicar ningún tipo de fuerza, ideal para todos los materiales, especialmente para los delicados y sensibles. Con el fácil uso y el alto rendimiento del microscopio SICM, provee a los investigadores alta calidad de imágenes en líquido, ayudándolos a comprender mejor el comportamiento a nanoescala de sus muestras en diversas soluciones.

## REFERENCES

1. Adiga, S.P., et al., Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2009. 1(5): p. 568-581.
2. Anmiv, S.P., et al., J. Phys. Condens. Matter, 2010. 22(45): p. 454107.
3. Tokarev, I. and S. Minko, Adv. Mater, 2010. 22(31): p. 3446-3462.
4. Chen, C., Derylo, M.A. and Baker, L.A., Anal. Chem., 2009. 81(12): p.4742-4751
5. Zhou, Y., Chen, C. and Baker, L.A., Anal. Chem., 2012. 84: p.3003-3009

For more information, please visit: [www.parksystems.com](http://www.parksystems.com)

3040 Olcott St. Santa, Clara CA 95054

[inquiry@parksystems.com](mailto:inquiry@parksystems.com),

+1 408-986-1110

*Park*  
SYSTEMS