

Laboratorio de Física II (ByG)
1er. Cuatrimestre 2015

Guía 1: Algo más que Reflexión y Refracción de la luz. Microscopía de Reflexión Total Interna, una forma de estudiar procesos celulares (tráfico de vesículas, dinámica de receptores de membrana, endocitosis, exocitosis).

Objetivos:

Estudiar los fenómenos de Reflexión y Refracción de luz.

Introducción:

Cuando un haz de luz incide sobre la superficie que separa dos medios transparentes, parte de la luz se refleja y parte se transmite. Esta guía sugiere una actividad muy sencilla que permite estudiar los fenómenos de reflexión y refracción de la luz cuando se incide en la interfase entre dos medios.

Las preguntas que te proponemos a continuación intentan orientarte en la toma y análisis de los datos. Te sugerimos que las leas atentamente y que vuelvas a ellas continuamente durante la adquisición y análisis de los datos.

- Dado un ángulo de incidencia ¿Cómo son los ángulos de reflexión y de refracción?. ¿De qué magnitudes puede depender?. ¿Qué cambiarías en las condiciones experimentales para probar la validez de tus suposiciones?
- ¿Qué métodos se te ocurren para la determinación de los ángulos? ¿Qué incerteza le asignarías a cada método?
- ¿Qué rango de ángulos de incidencia estudiaste?. ¿El fenómeno observado en todo el rango estudiado es siempre el mismo?

Actividades:

Para realizar esta experiencia te sugerimos usar el dispositivo de la figura 1, que consiste en un trozo de acrílico macizo sobre el que podés incidir usando un puntero láser. Tomá el dispositivo experimental de la figura 1 como lo que es: una sugerencia. No te restrinjas ni en esta práctica ni en ninguna otra solamente al estudio del fenómeno tal cual te lo presentamos. Al finalizar la clase esperamos que de mínima puedas discutir las preguntas que te formulamos a lo largo de la guía pero es muy recomendable que puedas explorar algún aspecto de tu interés durante la clase.

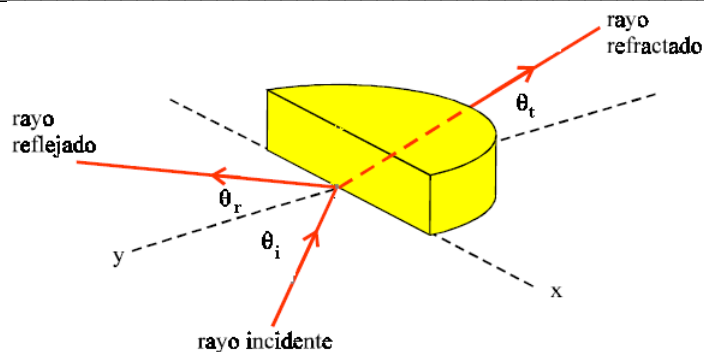


Figura 1: Esquema del dispositivo experimental sugerido, donde θ_i es el ángulo incidente, θ_r es el ángulo reflejado y θ_t es el ángulo transmitido.

Estudio Cualitativo:

- 1- Dado un haz incidente se puede observar un haz reflejado y un haz transmitido que forman ángulos θ_r , θ_i , θ_t con respecto a la normal a la interfase entre los medios. ¿Cómo son los ángulos de reflexión y de refracción?. ¿De qué magnitudes pueden depender?. ¿Qué cambiarías en las condiciones experimentales para probar la validez de tus suposiciones?
- 2- Los rayos reflejado y transmitido, ¿se observan para cualquier ángulo de incidencia? ¿Existe algún rango de ángulos donde alguno de ellos no se observa? ¿Es lo mismo incidir desde el aire o desde el acrílico?
- 3- En la figura 1 se sugiere incidir con el haz en el centro de la cara plana. ¿Es necesaria esta condición? ¿Por qué? El uso de un prisma de base semicilíndrica para estas experiencias, ¿tiene alguna ventaja particular? ¿Podría eliminarse esta condición?

Estudio Cuantitativo:

- 1- ¿Qué métodos se te ocurren para la determinación de los ángulos? ¿Qué incerteza le asignarías a cada método?
- 2- Dado un ángulo de incidencia ¿Cómo se relaciona éste con los ángulos de reflexión y de refracción?
- 3- La ley de Snell relaciona los ángulos de los haces al pasar de un medio a otro, a través de los índices de refracción de los medios: $n_1 \cdot \text{sen}\theta_1 = n_2 \cdot \text{sen}\theta_2$. El índice de refracción (n) es una característica propia del medio de propagación. En el vacío $n_{\text{vacío}} = 1$. Tus datos ¿se ajustan a esta ley?
- 4- ¿Cómo harías para calcular el índice de refracción del acrílico? ¿Alcanza con una sola medición? ¿Cómo calculas el error en el índice de refracción?

Algunos conceptos de microscopía de reflexión total interna:

El esfuerzo conjunto de biólogos, químicos, ingenieros, computadores y físicos han hecho avanzar la microscopía hasta el punto en el cual actualmente es posible visualizar moléculas individuales en tiempo real. Un claro ejemplo de esto es la Microscopía de Fluorescencia por Reflexión Total Interna (TIRF, TIRFM o a veces la llaman microscopía por onda evanescente) [Toomre 2001]-[Johns 2001]- [OlympusWeb].

La microscopía TIRF se está convirtiendo en una herramienta estándar en laboratorios de biofísica. Puede usarse para estudiar la dinámica de biomoléculas (difusión, plegamiento, agregación) en tiempo real con alta resolución espacial y de manera no invasiva incluso a nivel de moléculas únicas [Ishijima 1998]-[Kitamura 1999]-[Ishii 2000]-[Sako 2000].

TIRF hace uso de una interesante propiedad que tiene la luz al incidir en la interfase entre 2 medios transparentes de diferente índice de refracción, propiedad que quizás observaste cuando realizaste la actividad propuesta en esta guía. En un microscopio TIRF, el láser incide con un ángulo sobre la interfase entre el cubreobjetos y el *buffer*. Hay 2 maneras tradicionales de hacer esto, usando un prisma o un objetivo de microscopio Figura 2.

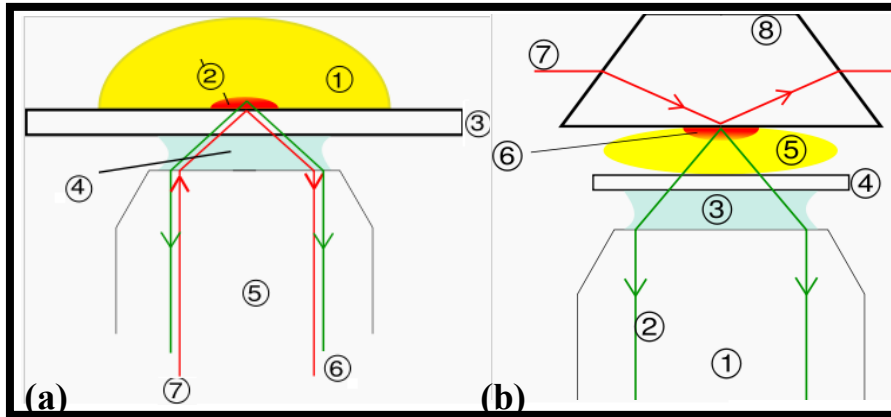


Figura 2: Esquemas de excitación TIRF. **(a)**: 1: muestra, 2: penetración de la onda evanescente, 3: cubreobjetos, 4: aceite de inmersión, 5: objetivo, 6: emisión, 7: excitación. **(b)**: 1: objetivo, 2: emisión, 3: aceite de inmersión, 4: cubreobjetos, 5: muestra, 6: penetración de la onda evanescente, 7: excitación, 8: prisma

Si el ángulo de incidencia es mayor que un ángulo crítico dado por:

$$\theta_{\text{critico}} = \sin^{-1} \left(\frac{n_1}{n_2} \right)$$

donde n_1 y n_2 son los índices de refracción del *buffer* y del cubreobjetos respectivamente, el haz será “totalmente” reflejado en la interfase, en ese caso decimos que estamos en el régimen de Reflexión Total Interna (RTI). En condiciones de RTI, cambian las características de la propagación de la luz en el medio 1. En esta situación aparece un tipo de propagación que se conoce como *onda evanescente* que significa que la intensidad de luz decae exponencialmente con la distancia a la interfase. Este fenómeno aparece como consecuencia de que el campo electromagnético debe ser continuo en la interfase entre los dos medios y, por lo tanto, luego de la reflexión “total” parte de la energía penetra en el medio 1. Para la mayor parte de las aplicaciones, la longitud de penetración de la onda evanescente en el medio 1, d , es de unos pocos cientos de nanómetros, y la intensidad a una distancia z de la interfase, $I(z)$ puede calcularse según:

$$I(z) = I_0 \exp \left[-\frac{z}{d} \right]$$

La alta resolución en la dirección perpendicular al cubreobjetos determina un volumen de observación del orden del femtolitro (10^{-15} litros).

Para una discusión más detallada sobre los conceptos de la microscopía TIRF acá van algunos reviews [Axelrod, D. 1984]-[Axelrod, D. 1989].

- Calculá el ángulo crítico para una interfase cubreobjetos-buffer acuoso. ¿Cómo se compara con el ángulo de Reflexión Total hallado en la esta actividad?
- ¿De qué parámetros crees depende la longitud de penetración, d . ¿Qué experimento diseñarías para probarlo?
- Para cual de estos experimentos usarías un microscopio TIRF. Difusión de una proteína en el núcleo de una célula adherente, Difusión en la membrana de una célula adherente. ¿Por qué?

Referencias:

[OlympusWeb]: www.microscopyu.com/articles/fluorescence/tirf/tirfintro.html

[Axelrod, D. 1984]: Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 13, 247-268.

[Axelrod, D. 1989]: Methods in Cell Bio. 30, 245-270.

[Toomre 2001]: Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. Trends Cell Biol. 11, 298-303.

[Johns 2001]: Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromatin cells. J. Cell Biol. 153, 177-190.

[Ishijima 1998]: Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. Cell 92, 161-171.

[Kitamura 1999]: A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometers. Nature 397, 129-134.

[Ishii 2000]: Single molecule detection in Life Science, Single Mol. 1,5-13.

[Sako 2000]: Single molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. Nat. Cell Biol. 2, 168-172.