



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
ELÉCTRICA – SISTEMAS ELECTRÓNICOS

NANOSCOPIA ÓPTICA DE BARRIDO POR LUZ PARA LA ADQUISICIÓN  
DE IMÁGENES A NANOESCALA

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
ING. RODRIGO ALEJANDRO OLVERA CARREÑO

TUTORA PRINCIPAL  
DRA. ELSI VIOLETA MEJÍA URIARTE  
INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA

CD. MX. , ENERO DE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Bruce Davidson Neil Charles

Secretario: Dra. Moumtadi Fátima

Vocal: Dra. Mejía Uriarte Elsi Violeta

1er. Suplente: Dr. Hautefeuille Mathieu Christian A.

2do. Suplente: Dr. Qureshi Naser

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA - UNAM

**TUTORA DE TESIS:**

DRA. ELSI VIOLETA MEJÍA URIARTE

-----  
**FIRMA**

## **Agradecimientos**

*Al Posgrado de Ingeniería Eléctrica impartido por la Facultad de Ingeniería de la UNAM por darme la oportunidad de desarrollarme académicamente en el área de investigación por medio de la maestría.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado mediante una de las Becas Nacionales 2016 con número de becario 609967 para la obtención del grado de Maestro.*

*A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el apoyo económico otorgado en el marco de los proyectos "Estudio del efecto de la temperatura y alta presión en nanoestructuras y nanopartículas por espectroscopía óptica y Raman" número IN106216 y "Estudio de la influencia de la luz en el auto-ensamble de nanopartículas metálicas" número IN102917. Así como al Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), por el apoyo económico otorgado en el marco del proyecto "Proyecto didáctico sobre la luz. Dispersión Rayleigh y Raman" número PE103437.*

*Al Laboratorio de Fotónica de Microondas del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, ICAT-UNAM.*

*Al Mtro. Raúl Ruvalcaba Morales del ICAT por su gran apoyo técnico, académico y moral.*

*Al Dr. Boris Escalante Ramírez del Departamento de Procesamiento de Imágenes de la Facultad de Ingeniería – UNAM por su apoyo académico en el área de procesamiento de imágenes.*

*A quienes, a través de equipo, consejos y/o sugerencias colaboraron con este proyecto de tesis compartiendo su experiencia en sus respectivos campos, al Dr. Roberto Sato, al Dr. Naser Qureshi y al Dr. Oleg Kolokoltsev del ICAT.*

*A mi jurado.*

*A mis compañeros y amigos en el ICAT, Álvaro, Lothar, Pedro y Claudia.*

*A mi familia, por su cariño, apoyo e inagotable paciencia.*

## Dedicatoria

*A mi mamá, Paty.*

*A mi papá, Alejandro.*

*A mi hermana, Dany.*

*Gracias por su amor incondicional, por su apoyo y por siempre empujarme a llegar más alto. Esto es por y para ustedes.*

*A mi pareja, Montse.*

*A mi hermano, Axel.*

*Gracias por su cariño, su apoyo y sus enseñanzas. Gracias por estar siempre a mi lado y por toda su paciencia.*

## Resumen

Se presenta un Nanoscopio de Barrido Óptico por Luz (NOBL) capaz de reconstruir imágenes generadas por los gradientes de absorción y reflexión de la luz sobre la superficie de la muestra. La topología de la superficie de la muestra favorece las variaciones de voltaje registradas por el fotodiodo y estos valores son utilizados para la obtención de una imagen. Este dispositivo combina un desplazamiento mecánico experimental a siete escalas distintas – desde 2.32  $\mu\text{m}$  hasta 56.15 nm por paso – con una resolución óptica de 197.64 nm, teniendo un costo de desarrollo menor en comparación con otros dispositivos de Microscopía Avanzada. Las imágenes reconstruidas mediante la operación del NOBL son procesadas a través de un programa de filtros espaciales los cuales permiten un análisis detallado de la muestra. Las muestras analizadas fueron divididas en orgánicas e inorgánicas: granos de polen y células de distintos tipos de cáncer para las primeras; y un microprocesador y hojuelas de grafito para las segundas. Las imágenes obtenidas de las muestras orgánicas presentan detalles de las células de cáncer y de los granos de polen que no se observan por microscopía óptica convencional; para las muestras inorgánicas, se observan detalles de la arquitectura del microprocesador y las terrazas del grafito son mostradas. Estos resultados obtenidos son validados con buena aproximación en relación con las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido obtenidas de la literatura.

# Índice General

Índice de Figuras .....	1
Objetivo General .....	6
Objetivos Particulares .....	6
Justificación .....	6
Contenido.....	7
Capítulo 1: Antecedentes .....	8
1.1 <i>La invención del microscopio</i> .....	8
1.2 <i>Primer teñido histológico y síntesis de fluoresceína</i> .....	9
1.3 <i>Teoría del límite de difracción</i> .....	10
1.4 <i>El microscopio de fluorescencia (Fluorescence Microscope)</i> .....	12
1.5 <i>El microscopio de contraste de fase (Phase Contrast Microscope)</i> .....	14
1.6 <i>Contraste de interferencia diferencial (Differential Interference Contrast)</i> .....	15
1.7 <i>Microscopía confocal (Confocal Microscopy)</i> .....	17
1.8 <i>FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) y FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)</i> .....	19
1.9 <i>Microscopía de Fluorescencia de Reflexión Interna Total (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy)</i> .....	20
1.10 <i>Microscopía de Deconvolución (Deconvolution Microscopy)</i> .....	21
1.11 <i>Microscopía de dos fotones (Two Photon Microscopy)</i> .....	21
1.12 <i>Microscopía de hoja de luz (Light Sheet Microscopy)</i> .....	22
1.13 <i>Microscopía de campo cercano (Near-field Scanning Optical Microscopy)</i> .....	23
1.14 <i>Rompiendo el límite de difracción</i> .....	24
<i>Referencias del capítulo:</i> .....	25
Capítulo 2: Fundamentos Teóricos .....	29
2.1 <i>Radiación Electromagnética</i> .....	29
2.1 <i>Haz de Luz</i> .....	31
2.2 <i>Interacciones de un haz de luz con una superficie</i> .....	31
2.3 <i>Reflexión</i> .....	32
2.4 <i>Formación de imágenes en un espejo plano</i> .....	32
2.5 <i>Láser de Semiconductor</i> .....	34
2.5.1 <i>Diodo Láser (LD – Laser Diode)</i> .....	35
2.5.2 <i>Diodos Láser de Nitruro de Galio-Indio (InGaN)</i> .....	36

<b>2.6 Luz Colimada</b> .....	36
<b>2.6.1 Colimador óptico</b> .....	37
<b>2.7 Divisor de haz</b> .....	37
<b>2.8 Objetivo de Microscopio</b> .....	38
<b>2.8.1 Objetivos Acromáticos:</b> .....	39
<b>2.8.2 Objetivos de Fluorita o Semi-Apocromáticos:</b> .....	39
<b>2.8.3 Objetivos Apocromáticos:</b> .....	39
<b>2.9 Fotodiodo</b> .....	40
<b>2.10 Motor de Pasos</b> .....	42
<b>Referencias del capítulo</b> .....	43
<b>Capítulo 3 Nanoscopía óptica</b> .....	45
<b>3.1 El origen de la Nanoscopía</b> .....	45
<b>3.2 STED (Stimulated Emission Depletion)</b> .....	47
<b>3.3 SIM (Structured Illumination Microscopy)</b> .....	49
<b>3.4 Single-Molecule Positioning Methods (SMPM)</b> .....	51
<b>3.5 Comparación entre técnicas</b> .....	53
<b>3.6 Ejemplos en Nanotecnología</b> .....	54
<b>Referencias del capítulo</b> .....	55
<b>Capítulo 4 Instrumentación</b> .....	59
<b>4.1 Sistema Óptico</b> .....	59
<b>4.1.1 Fuente de luz y accesorios ópticos</b> .....	59
<b>4.1.2 Objetivo</b> .....	61
<b>4.1.3 Fotodiodo</b> .....	62
<b>4.2 Sistema Mecánico</b> .....	67
<b>4.2.1 Platinas</b> .....	67
<b>4.2.2 Motores de pasos</b> .....	68
<b>4.3 Sistema Electrónico</b> .....	70
<b>4.3.1 Controlador para el motor ZF13B</b> .....	70
<b>4.3.2 Controlador del Diodo Láser</b> .....	72
<b>4.3.3 Tarjeta de adquisición de datos</b> .....	73
<b>Referencias del capítulo</b> .....	74
<b>Capítulo 5 Análisis de Software</b> .....	76
<b>5.1 LabVIEW (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench)</b> .....	76



<b>5.2 MATLAB (Matrix Laboratory)</b> .....	76
<b>5.3 Kinesis</b> .....	77
<b>5.4 El Programa Principal del Nanoscopio</b> .....	78
<b>5.5 Implementación del eje Z a través de Kinesis en LabVIEW</b> .....	83
<b>5.6 Procesamiento de imágenes</b> .....	89
5.6.1 Filtro de bloque .....	90
5.6.2 Filtro binomial .....	91
5.6.3 Filtros detectores de bordes .....	92
5.6.4 Filtros unsharp masking .....	96
<b>Referencias del capítulo</b> .....	97
<b>Capítulo 6 Resultados y Discusión</b> .....	99
<b>6.1 Muestras Biológicas</b> .....	103
6.1.1 Polen para Consumo Humano .....	103
6.1.2. Células de Cáncer Cervicouterino (HeLa).....	107
6.1.3. Células de Cáncer de Pulmón (H1299).....	115
<b>6.2 Muestras No Biológicas</b> .....	119
6.2.1 Microprocesador Intel i486 SX.....	119
6.2.2 Hojuelas de Grafito.....	125
<b>Referencias del capítulo:</b> .....	132
<b>Conclusiones</b> .....	134
<b>Trabajo a futuro</b> .....	136
<b>Apéndices</b> .....	137
<b>Apéndice A: Hojas de Datos</b> .....	137
<b>Apéndice B: Programa de Filtros Espaciales</b> .....	159
<b>Apéndice C: Sistema de barrido utilizando los ZFS13B</b> .....	165



## Índice de Figuras

Figura	Título	Página
1.1	Dibujos de los instrumentos utilizados por Robert Hook	8
1.2	Manifestación física del Disco de Airy.	10
1.3	Imagen de una célula vegetal obtenida a través de Microscopía de Fluorescencia.	14
1.4	Imagen de células bucales del ser humano obtenida a través de Microscopía de Contraste de Fase.	15
1.5	Los componentes básicos de un arreglo experimental para microscopía de contraste de interferencia diferencial.	16
1.6	Imagen de algas microscópicas obtenida a través de Microscopía de Contraste de Interferencia Diferencial.	16
1.7	Comparación estructural ente un Microscopio Convencional y un Microscopio Confocal.	18
1.8	Imagen de una neurona humana obtenida a través de Microscopía Confocal.	19
1.9	Diagrama de un microscopio TIRF.	20
1.10	Imagen de una célula HeLa sana obtenida por microscopía de deconvolución.	21
1.11	Imagen de un coral obtenida a través de Microscopía de Hoja de Luz.	23
1.12	Diagrama a bloques de un arreglo experimental de NSOM.	24
1.13	Imagen de un patrón triangular en PMMA obtenida a través de Microscopía de Campo Cercano.	24
2.1	Representación clásica de una onda electromagnética.	29
2.2	Espectro electromagnético.	30
2.3	Interacciones de un haz de luz con una superficie.	31
2.4	Haz de luz reflejado por un espejo.	32
2.5	Formación de una imagen real y una imagen virtual de un objeto puntual.	33
2.6	Representación en un sistema cartesiano de la formación de imágenes.	34
2.7	Origen físico de la ganancia en un semiconductor.	34
2.8	Esquemático de un diodo láser de baja potencia de borde emisor.	35
2.9	Representación de haces de luz colimados y no colimados.	36
2.10	Ejemplo de un colimador óptico.	37
2.11	Diseño esquemático de un divisor de haz.	37
2.12	Diagrama comparativo de objetivos 10x acromáticos, de fluorita y apocromáticos.	39
2.13	Curva característica de un fotodiodo.	40
2.14	Funcionamiento simplificado de un motor de pasos.	41
3.1	Contraste producido por distintas separaciones de dos objetos puntuales.	45
3.2	Representación esquemática de la capacidad de resolver objetos menores a la escala de resolución.	45
3.3	Arreglo experimental habitual de Microscopía STED.	46
3.4	Ejemplo de resolución de microscopía STED en comparación con microscopía confocal y AFM.	47

3.5	Arreglo experimental habitual de SIM y patrón de iluminación de SIM.	49
3.6	Comparación de resultados entre Microscopía Confocal y SIM de macromoléculas biológicas a 130 nm.	50
3.7	Moléculas siendo observadas simultáneamente y moléculas siendo observadas de manera aislada.	50
3.8	Arreglo para Identificación de Moléculas Aisladas.	51
4.1	Diagrama de los componentes del dispositivo.	58
4.2	Diodo láser DL-5146-101S.	59
4.3	Montura con conexión y lente esférica.	59
4.4	Esquemático de la unión entre la montura, el diodo y el tubo colimador.	59
4.5	Divisor de haz.	60
4.6	Objetivo Nikon 100X.	60
4.7	Curva de transmitancia del objetivo.	61
4.8	Fotodiodo OPT301.	62
4.9	Respuesta espectral del OPT301.	62
4.10	Conexión básica de operación del OPT301.	63
4.11	Diseño de la tarjeta de operación del OPT301.	63
4.12	Tarjeta del OPT301 finalizada.	64
4.13	Caja de aluminio para protección del OPT301.	64
4.14	Diagrama del circuito para la fuente de alimentación del OPT301.	64
4.15	Fuente de alimentación del OPT301 ensamblada.	65
4.16	Matriz de respuesta del OPT301.	65
4.17	Sistema de platinas RB13M.	66
4.18	Motor NEMA17 y su diagrama de conexión.	67
4.19	Motor ZFS13B.	68
4.20	Diagrama de pines de un motor ZFS13B.	69
4.21	Controlador KST101.	70
4.22	Panel frontal del controlador KST101.	71
4.23	Fuente controladora LDC201CU.	72
4.24	Tarjeta de adquisición NI USB 6343.	73
5.1	Señales seno y coseno para 1 micropaso.	77
5.2	Señales seno y coseno para 64 micropasos.	78
5.3	Diagrama de flujo del programa del Nanoscopio.	79
5.4	Diagrama de bloques del programa del Nanoscopio.	80
5.5	Panel principal del programa del Nanoscopio.	81
5.6	Arquitectura de sistema sugerida.	82
5.7	Controlador dentro del diagrama de bloques de LabView a través de .Net.	83
5.8	Validación del controlador a través del Número de Serie.	83
5.9	Diagrama de funcionamiento básico para Kinesis dentro de LabView.	83
5.10	Método para terminar comunicación entre KST101 y la computadora.	84
5.11	Diagrama de bloques para monitoreo de posición absoluta de un motor.	85
5.12	Estructura que garantiza el inicio del programa en la posición <i>Home</i> .	85
5.13	Métodos para trasladar el motor a una posición absoluta.	86

5.14	Panel principal del programa para la operación del eje Z para ajuste del enfoque.	86
5.15	Diagrama de bloques del programa para la operación del eje Z para ajuste del enfoque.	87
5.16	Imagen obtenida de la plantilla de calibración USAF 1951, zona 5, subzona 6.	90
5.17	Imagen base procesada utilizando un filtro de bloque de 11 x 11.	90
5.18	Imagen base procesada utilizando un filtro binomial de 11 x 11.	92
5.19	Primeras dos derivadas de la función Gaussiana.	93
5.20	Filtro $h(x)=\delta(x)-\delta(x-1)$ .	94
5.21	Filtro $h(x)=\delta(x+1)-\delta(x-1)$ .	94
5.22	Imagen base procesada utilizando un filtro detector de bordes a través de una primera derivada Gaussiana de 11 x 11.	95
5.23	Imagen base procesada utilizando un filtro detector de bordes a través de una segunda derivada Gaussiana de 11 x 11.	95
5.24	Imagen base procesada utilizando un filtro detector de bordes Laplaciano.	96
5.25	Imagen base procesada utilizando un filtro <i>unsharp masking</i> de 7 x 7.	97
6.1	Arreglo experimental del Nanoscopio de Barrido Óptico por Luz (NOBL).	99
6.2	Plantilla USAF 1951.	101
6.3	Imagen obtenida a 56.15 nm por pixel.	101
6.4	Imagen obtenida a través del sistema de barrido XY con los motores ZFS13B a 477 nm por pixel.	102
6.5	Imagen cruda a 56.15 nm por pixel de un grano de polen.	103
6.6	Imagen óptica amplificada a 100X de granos de polen.	103
6.7	Imagen de SEM de un grano de polen.	103
6.8	Imágenes crudas de granos de polen a distintos factores de micropaso.	104
6.9	Imágenes filtradas de granos de polen a distintos factores de micropaso.	105
6.10	Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 56.15 nm por pixel de 5 x 5 $\mu\text{m}$ con la imagen obtenida a través de SEM.	106
6.11	Imagen cruda a 170 nm por pixel de una célula HeLa.	107
6.12	Imagen óptica a 100X de un conjunto de células HeLa.	107
6.13	Imagen de AFM de una célula HeLa.	107
6.14	Imagen SEM de un par de células HeLa.	107
6.15	Imágenes crudas de células HeLa a distintos factores de micropaso.	108
6.16	Imágenes filtradas de células HeLa a distintos factores de micropaso.	109
6.17	Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 170 nm por pixel de 34 x 34 $\mu\text{m}$ con la imagen obtenida a través de SEM.	110
6.18	Imagen cruda a 325 nm por pixel de una célula HeLa cortada por la mitad.	111
6.19	Imagen de AFM de una célula HeLa cortada por la mitad.	111
6.20	Imágenes crudas de una célula HeLa rebanada a distintos factores de micropaso.	112
6.21	Imágenes filtradas de una célula HeLa rebanada a distintos factores de micropaso.	113

6.22	Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 115 nm por pixel de 11.5 x 11.5 $\mu\text{m}$ con la imagen obtenida a través de AFM.	114
6.23	Imagen cruda a 325 nm por paso de una célula H1299.	115
6.24	Imagen óptica a 100X de un conjunto de células H1299.	115
6.25	Imagen cruda a 2.32 $\mu\text{m}$ por paso de un conjunto de células H1299.	115
6.26	Imagen SEM de una célula H1299.	115
6.27	Imágenes crudas de un conjunto de células H1299 a distintos factores de micropaso.	116
6.28	Imágenes filtradas de un conjunto de células H1299 a distintos factores de micropaso.	117
6.29	Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 325 nm por pixel de 75 x 75 $\mu\text{m}$ con la imagen obtenida a través de SEM.	118
6.30	Procesador Intel i486 SX dentro de la placa de conexión y aislamiento térmico.	119
6.31	Imagen cruda a 170 nm por pixel de los canales MOSFET del microprocesador.	120
6.32	Imagen óptica a 100X de los canales MOSFET de la primera y segunda capa del microprocesador.	120
6.33	Imagen SEM de un MOSFET.	120
6.34	Imagen cruda a 170 nm por pixel de uno de los MOSFET del microprocesador.	120
6.35	Imagen SEM de los canales MOSFET del microprocesador.	120
6.36	Imágenes crudas de distintas zonas del microprocesador a distintos factores de micropaso.	121
6.37	Imágenes filtradas de distintas zonas del microprocesador a distintos factores de micropaso.	122
6.38	Zonas del microprocesador analizadas de manera independiente.	122
6.39	Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 170 nm por pixel de 30 x 20 $\mu\text{m}$ con la imagen obtenida a través de SEM.	123
6.40	Imágenes cruda y filtrada a 325 nm por pixel de los MOSFET en la primera capa del microprocesador de 50 x 50 $\mu\text{m}$ .	123
6.41	Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 170 nm por pixel de 17 x 17 $\mu\text{m}$ con la imagen obtenida a través de SEM.	124
6.42	Hojuelas de grafito.	125
6.43	Imagen a 1.25 $\mu\text{m}$ por pixel de un surco en la hojuela de grafito.	126
6.44	Imagen SEM de hojuelas de grafito.	126
6.45	Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 2.32 $\mu\text{m}$ por pixel de 85 x 85 $\mu\text{m}$ .	126
6.46	Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 1.3 $\mu\text{m}$ por pixel de 82 x 82 $\mu\text{m}$ .	126
6.47	Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 625 nm por pixel de 26 x 26 $\mu\text{m}$ .	127
6.48	Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 325 nm por pixel de 26 x 26 $\mu\text{m}$ .	127
6.49	Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 115 nm por pixel de 23 x 23 $\mu\text{m}$ .	127

6.50	Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 56.15 nm por pixel de 11 x 11 $\mu\text{m}$ .	127
6.51	Imagen de varias terrazas de la hojuela de grafito a 56.15 nm por pixel.	128
6.52	Imagen SEM de hojuelas de grafito	128
6.53	Imagen de la hojuela de grafito a 2.32 $\mu\text{m}$ por pixel de 116 x 116 $\mu\text{m}$ .	129
6.54	Imagen de la hojuela de grafito a 1.3 $\mu\text{m}$ por pixel de 104 x 104 $\mu\text{m}$ .	129
6.55	Imagen de la hojuela de grafito a 625 nm por pixel de 87 x 87 $\mu\text{m}$ .	129
6.56	Imagen de las terrazas de la hojuela de grafito a 325 nm por pixel de 65 x 65 $\mu\text{m}$ .	129
6.57	Imagen de las terrazas de la hojuela de grafito a 115 nm por pixel de 34 x 34 $\mu\text{m}$ .	130
6.58	Imagen de las terrazas de la hojuela de grafito a 56.15 nm por pixel de 28 x 28 $\mu\text{m}$ .	130
6.59	Imagen de la hojuela de grafito a 2.32 $\mu\text{m}$ por pixel de 116 x 116 $\mu\text{m}$ .	131
6.60	Imagen de la hojuela de grafito a 1.3 $\mu\text{m}$ por pixel de 120 x 120 $\mu\text{m}$ .	131
6.61	Comparación entre la imagen a 625 nm por pixel de la hojuela de grafito de 125 x 125 $\mu\text{m}$ con la imagen SEM de una hojuela de grafito.	131

## Objetivo General

Mejorar la sensibilidad del Nanoscopio Óptico de Barrido por Luz (NOBL) para obtener imágenes a nanoescala.

## Objetivos Particulares

- Implementar un sistema de platinas X-Y con desplazamiento experimental de decenas de nanómetros.
- Optimizar la respuesta del fotodetector para diferentes longitudes de onda.
- Desarrollar un software capaz de discretizar las variaciones de la respuesta del detector.
- Implementar un eje Z para ajuste de enfoque.
- Obtener imágenes de elementos nano y micrométricos de distintas propiedades ópticas.

## Justificación

El avance de la Nanociencia y Nanotecnología demandan el poder tener a disposición equipos capaces de observar los materiales y dispositivos que se fabrican. Los equipos actuales en técnicas de microscopia electrónica, microscopia confocal, de fuerza atómica y otras más, requieren de grandes inversiones e infraestructura adecuada, las cuales no están disponibles en todos los laboratorios. Por ello, se propone el desarrollo de un nanoscopio óptico capaz de poder observar imágenes de decenas de nanómetros a través de una inversión mucho menor a la necesaria para las técnicas antes mencionadas.



## Contenido

En esta tesis se presentan las imágenes obtenidas por un Nanoscopio Óptico de Barrido por Luz, NOBL, desarrollado en el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Nanoscopio une la resolución óptica teórica, limitada por todos los componentes ópticos, y el desplazamiento mecánico experimental brindado por motores de pasos.

Se describe el contenido de la presente tesis:

En el Capítulo 1, *Antecedentes*, se hace un breve recorrido a través de la historia de la Microscopía convencional, comenzando a partir de la invención del Microscopio hasta llegar al desarrollo de la Nanoscopía, rompiendo el límite de difracción.

En el Capítulo 2, *Fundamentos Teóricos*, se presenta la parte teórica que fundamenta el funcionamiento de los componentes, ópticos, electrónicos y mecánicos que conforma al Nanoscopio.

En el Capítulo 3, *Nanoscopía Óptica*, se explica el concepto de Nanoscopía, el fundamento teórico de los dispositivos más utilizados en la Nanoscopía Óptica y se presentan algunos de los avances más recientes del tema y sus aplicaciones en la nanotecnología.

En el Capítulo 4, *Instrumentación*, se describen a detalle los componentes utilizados en el desarrollo experimental de este Nanoscopio, así como las caracterizaciones que se llevaron a cabo para algunos de ellos. Estos componentes se encuentran distribuidos en sistemas según su principio de funcionamiento: Óptico, Electrónico y Mecánico.

En el Capítulo 5, *Análisis de Software*, se documenta el desarrollo de los programas que operan al Nanoscopio, así como los filtros espaciales que se utilizan para mejorar las imágenes obtenidas en él.

En el Capítulo 6, *Resultados y Discusión*, se presentan los elementos analizados en el desarrollo de este trabajo, así como algunas características de estos; asimismo, se presentan las imágenes obtenidas junto con la discusión de los resultados obtenidos a partir de cada una.

Finalmente se presentan las *Conclusiones* de este trabajo, así como las recomendaciones y expectativas para *Trabajo a Futuro*.

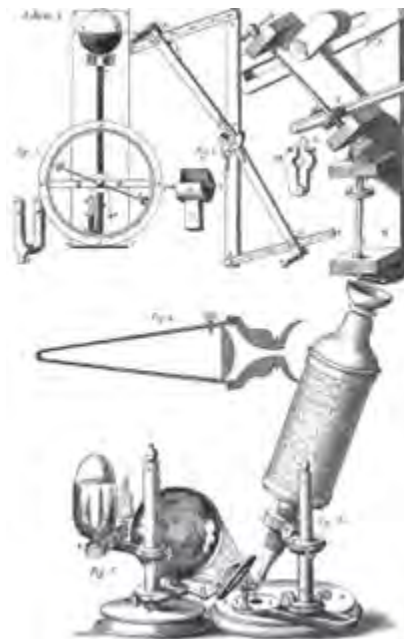
## Capítulo 1: Antecedentes

### 1.1 La invención del microscopio

Si definimos al microscopio como un instrumento que nos permite la visualización de objetos usualmente invisibles ante el ojo humano, ellos aparecieron a finales del siglo XVI. Las propiedades cóncavas y convexas de los lentes se describieron por primera vez alrededor del año 1000, aunque el uso de cristales o vidrio como lupas pudo haberse dado mucho antes.

En 1595 el holandés William Borel, enviado a la corte de Francia, mencionan al creador de espectaculares, Hans Janssen y a su hijo Zacharias como los inventores del primer microscopio compuesto. Su microscopio constaba de dos lentes combinados en un tubo, en el cual la magnificación era variada al modificar la distancia entre los lentes. Sin embargo, los Janssen jamás publicaron observaciones realizadas a través de dicho microscopio; en su lugar, los dos nombres asociados con el origen de la microscopía son Robert Hooke y Antonie van Leeuwenhoek [1].

La obra maestra de Hooke, conocida simplemente como *Micrographia*, se publicó en 1665 y es el primer libro de microscopía publicado por un científico. Su refinado microscopio compuesto, descrito e ilustrado en el prefacio de su libro, fue un precursor de los microscopios modernos, ver **Fig. 1.1**. Este microscopio estaba compuesto por un portaobjetos, una fuente de luz y tres lentes ópticos.



**Fig. 1.1.** Dibujos de los instrumentos utilizados por Robert Hook [2].

*Micrographia* estableció teorías científicas de diversas índoles, así como descripciones de especímenes vistos a través del dispositivo de Hooke. Entre otros, observó la estructura porosa del corcho y describió dichas porosidades como “celdas o células”; aunque no eran células desde el punto de vista biológico, el término que se usa hoy en día se derivó de esta observación. Hooke también fue el primero en describir la apariencia de un objeto teñido, como la madera o el cabello. El libro demostró por primera vez lo que la microscopía podía hacer por la ciencia.

*“... y con la ayuda de los Microscopios, no hay nada tan pequeño que pueda escaparse de nuestra investigación...” Robert Hooke [2]*

Van Leeuwenhoek era un costurero holandés sin entrenamiento científico, quien quedó fascinado con los lentes que se usaban en las lupas para contar los hilos de la ropa. Aprendió a pulir lentes y desarrolló varias técnicas para ello. Ensambló más de quinientos microscopios simples, todos contenían una única y pequeña lente convexa capaz de visualizar detalles de hasta 1 micrómetro. Se volvió extremadamente hábil disecando y montando especímenes; fue el primero en describir los espermatozoides y vida en las gotas de agua (bacterias y protozoarios) [3].

La introducción de múltiples lentes incrementó los problemas con las aberraciones esféricas y cromáticas. Los dispositivos simples de Van Leeuwenhoek eran superiores a los de Hooke, y muchos científicos y aficionados siguieron usando microscopios de una sola lente hasta que las lentes acromáticas (corregían la aberración cromática) se volvieron populares a inicios del siglo XIX [4].

### ***1.2 Primer teñido histológico y síntesis de fluoresceína***

A pesar de que muchos científicos reportaron el uso de soluciones de tinción bajo el microscopio tras las observaciones de Hooke, fue hasta 1858 que Joseph von Gerlach, mientras experimentaba con soluciones de carmín, dejó una sección de tejido cerebral en una solución diluida de carmín por una noche entera, reportando un teñido diferencial aceptable del núcleo y los granulomas nucleares a comparación de un teñido muy tenue del citoplasma y de la sustancia intercelular. Concluyó que las soluciones de tinción anteriores habían estado muy concentradas, y también notó que el colorante había sido absorbido por elementos celulares específicos y no podía ser removido [5].

A inicios del siglo XX se descubrieron diversos fenómenos citológicos y se desarrollaron nuevos tintes y colorantes sintéticos. El uso de tinte plateado en la citología fue promovido por Camillo Golgi en 1873 y se volvió famoso debido a las detalladas observaciones neuro-anatómicas de Santiago Ramón y Cajal. La noción de que los colorantes básicos y ácidos eran histológicamente distintos fue importante para el desarrollo del tinte de hematoxilina y de eosina (Paul Mayer, 1896), el cual se volvió un colorante clave para diagnósticos. Un tinte ácido (eosina) y un tinte básico (azul de metileno) también formaron la base del

colorante Giemsa (Gustav Giemsa, 1904), el cual aún se usa para diagnosticar malaria y otros parásitos. En 1924, Robert Feulgen descubrió que el material cromosómico puede ser teñido con una reacción química basada en la hidrólisis ácida del ADN, y se volvió una piedra angular de la citoquímica [6].

Aunque los tintes provean de contraste suficiente para cambiar las propiedades de absorción de la luz de distintas estructuras celulares, la fluorescencia provee contraste con el equipo adecuado. La descripción más antigua de fluorescencia data del siglo XVI, cuando Nicolás Monardes reportó las propiedades fluorescentes de un extracto de madera. La descripción de John Herschel de las propiedades fluorescentes del sulfato de quinina en 1845, junto con la monografía de George Stokes publicada en 1852, son consideradas como el hito moderno de observación y descripción de la fluorescencia [7] [8].

Con el desarrollo de la industria de los colorantes sintéticos, no pasó mucho tiempo para que Adolf von Bayer sintetizara el primer colorante fluorescente, la fluoresceína, en 1871. Paul Ehrlich utilizó el colorante fluorescente "uranina", en 1882 para determinar el camino de la secreción de humor acuoso del ojo, representando el primer uso de un colorante fluorescente en la fisiología animal [9].

### ***1.3 Teoría del límite de difracción***

Las observaciones a través de un microscopio tienen un límite físico, lo que consecuentemente restringe nuestra visión del mundo celular. En la microscopía óptica, cuando la luz pasa a través de una apertura, es difractada, afectando la resolución espacial o, en otras palabras, la separación más pequeña que puede haber entre dos objetos para aún ser distinguidos. La difracción es un fenómeno que se da cuando un frente de onda se ve impedido por cualquier objeto, modificando el frente de onda de acuerdo con la forma del impedimento. Cuando este objeto es una lente, el patrón de difracción creado por el paso de la luz a través de ella se conoce como "Disco de Airy", como se describió por George Airy en 1835, ver **Fig. 1.2 [10]**.



**Fig. 1.2.** Manifestación física del Disco de Airy.

La intensidad del patrón del Disco de Airy está dada por el módulo al cuadrado de la Transformada de Fourier de la apertura circular.

$$I(\theta) = I_0 \left( \frac{2J_1(ka \sin \theta)}{ka \sin \theta} \right)^2 = I_0 \left( \frac{2J_1(x)}{x} \right)^2 \quad (1.1)$$

Donde  $I_0$  es la intensidad máxima del centro del Disco de Airy,  $J_1$  es la función de Bessel de primer tipo de orden uno,  $k = 2\pi/\lambda$  es el número de onda,  $a$  es el radio de la apertura y  $\theta$  es el ángulo de observación.

$$x = ka \sin \theta = \frac{2\pi a}{\lambda} \frac{q}{R} = \frac{\pi q}{\lambda N} \quad (1.2)$$

Donde  $q$  es la distancia radial desde el eje óptico hacia el plano de observación (o focal) y  $N = R/d$  ( $d=2a$  es el diámetro de la apertura,  $R$  es la distancia de observación desde la apertura) es el número f del sistema.

Los ceros de  $J_1(x)$  se encuentran en:

$$x = ka \sin \theta \approx 3.8317, 7.0156, 10.1735, 13.3237, 16.4706 \dots \quad (1.3)$$

A partir de esto se obtiene que el primer anillo oscuro del patrón de difracción ocurre cuando  $ka \sin \theta = 3.8317$  o mejor dicho:

$$\sin \theta \approx \frac{3.83}{ka} = \frac{3.83\lambda}{2\pi a} = 1.22 \frac{\lambda}{2a} = 1.22 \frac{\lambda}{d} \quad (1.4)$$

El radio  $q_1$  del primer anillo oscuro en una pantalla está relacionado con  $\theta$  y con el número f por:

$$q_1 = R \sin \theta \approx 1.22 R \frac{\lambda}{d} = 1.22\lambda N \quad (1.5)$$

Siguiendo con esta aproximación, se pueden calcular los radios de los anillos oscuros subsecuentes [11].

Posteriormente, las fundaciones matemáticas para cuantificar el límite de difracción en la microscopía fueron descritas y formalizadas por Ernst Abbe en 1873. Reportó que la distancia más pequeña resoluble entre dos puntos usando un microscopio convencional jamás podría ser más pequeña que la mitad de la longitud de onda de la luz de la imagen. La ecuación de Abbe describe la resolución en un sistema óptico perfecto:

$$d = \frac{0.612 \times \lambda}{n \sin a} \tag{1.6}$$

Donde:

$d$  es la resolución.

$\lambda$  es la longitud de onda de la radiación de la imagen.

$n$  es el índice de refracción del medio entre la fuente puntual y la lente.

$a$  es la mitad del ángulo de apertura en radianes.

Basados en esta ecuación, uno puede mejorar la resolución espacial al usar luz con una longitud de onda menor [12] [13].

En el Capítulo 3 de la presente tesis se hace mayor énfasis en esta teoría.

#### ***1.4 El microscopio de fluorescencia (Fluorescence Microscope)***

Inspirado en los descubrimientos de Ernst Abbe de que una longitud de onda menor lleva a una mayor resolución, August Köhler construyó el primer microscopio ultravioleta (UV) en Alemania en 1904. El instrumento utilizaba iluminación UV de una lámpara de cadmio y permitía la reproducción fotográfica de objetos con el doble de resolución de un microscopio de luz visible. Köhler notó que algunos objetos emitían luz de una longitud de onda más grande al ser iluminados con luz UV, pero fue hasta 1911 que Oskar Heimstädt usó estas observaciones como base para la construcción del primer microscopio de fluorescencia. Heimstädt se encontró con dos grandes problemas: concentrar suficiente luz UV sobre la muestra para que esta presentara fluorescencia; y capturar la luz emitida por la fluorescencia libre de cualquier ruido. Para combatir el primer problema, Heimstädt utilizó filtros construidos por Hans Moritz Lehman para eliminar toda la luz, a excepción de la UV proveniente de la lámpara. Para combatir el segundo problema, empleó iluminación de campo oscuro para asegurarse de que no entrara luz de excitación a través de la lente de objetivo y así proveer alto contraste para la señal de fluorescencia [14].

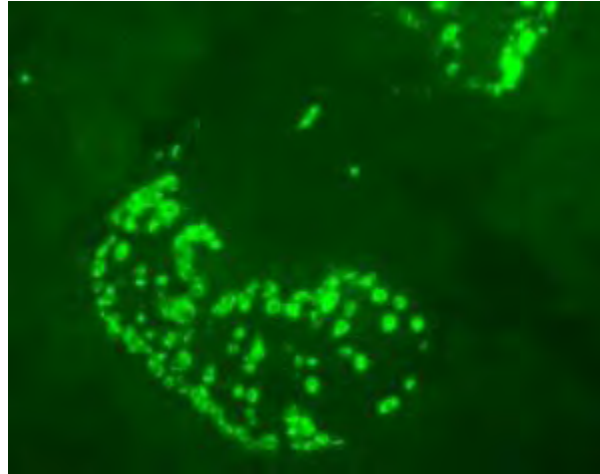
A pesar de haber podido visualizar bacterias, Heimstädt no estaba convencido de que el microscopio de fluorescencia fuese a tener un gran impacto, concluyendo su artículo de la siguiente manera:

*"Si es que y a qué grado el microscopio de fluorescencia expandirá las posibilidades de la visualización microscópica sólo el futuro lo dirá."* **Oskar Heimstädt [14]**

Ambos problemas fueron superados durante las siguientes dos décadas, cuando el investigador austriaco Max Haitinger desarrolló una técnica de fluorescencia secundaria, la cual involucraba aplicar químicos fluorescentes exógenos, acuñando así el término "fluorocromo". Los fluorocromos son esenciales para el uso de la fluorescencia en la microscopía de tejido vivo, y fueron pieza clave para el desarrollo del Microscopio de Luz Incidente de Epi-Fluorescencia. En ellos, la fuente de luz se encontraba del mismo lado que la muestra y que el objetivo. La luz de excitación y de emisión pasaban a través del objetivo. Esta configuración permitía una excitación más eficiente de las muestras y la visualización de objetos opacos. El prototipo de este microscopio fue diseñado en 1929 por el farmacólogo alemán Philipp Ellinger y el anatomista August Hirt. En lo que llamaron el "microscopio intravital" la luz de excitación pasaba a través de una serie de filtros antes de que la longitud de onda deseada llegara al objetivo y provocar la emisión de luz fluorescente sobre la muestra. Un filtro de barrera amarilla entre el objetivo y el ocular prevenía que la luz de excitación reflejada interfiriera con la observación [15].

Otro avance importante en el campo de la microscopía de fluorescencia llegó 40 años después, con la invención de los divisores de haz dicromáticos o espejos dicróicos. En lugar de absorber ciertas longitudes de onda, como lo hacían los filtros habituales, los espejos dicróicos reflejaban sólo unas cuantas longitudes de onda, mientras que transmitían todas las demás, permitiendo iluminación de la muestra con una longitud de onda precisa, asegurándose de que nada de la luz de excitación pasara a través del ocular. El científico holandés Johan Sebastiaan Ploem es a quién se le atribuye una gran parte del desarrollo de estos espejos debido a la descripción de la iluminación vertical incidente con estos espejos en 1967. Ubicados en un ángulo de 45° con respecto a la luz de excitación, el espejo reflejaba hasta el 95% de la longitud de onda más corta de la luz de excitación, pero transmitía la longitud de onda más grande. El haz reflejado de la luz de excitación luego entraba al objetivo, el cual funcionaba como condensador, asegurándose de la excitación de la muestra. La luz fluorescente emitida luego era recolectada por el objetivo, pasaba por el espejo dicromático nuevamente y llegaba a un filtro de barrera en el ocular [16].

Gracias a la invención de los espejos dicróicos, el microscopio de epi-fluorescencia pasó de ser una herramienta que solo podía ser utilizada por los especialistas a un instrumento universal e indispensable para la biología moderna [17].



**Fig. 1.3.** Imagen de una célula vegetal obtenida a través de Microscopía de Fluorescencia [17].

### ***1.5 El microscopio de contraste de fase (Phase Contrast Microscope)***

En 1930, el físico Frits Zernike se encontraba estudiando la óptica de las rejillas de difracción cuando su laboratorio adquirió una rejilla cóncava de tamaño considerable. Debido a su tamaño, Zernike tuvo que colocar un pequeño telescopio a 6 metros de su superficie para visualizar los patrones de luz generados por las rejillas. Normalmente, esto resultaría en un patrón de rayas, pero cuando Zernike enfocó su telescopio en la rejilla, descubrió algo sorprendente: los patrones de rayas habían desaparecido [18]. El determinar por qué había sucedido esto le otorgó a Zernike el Premio Nobel de Física en 1953.

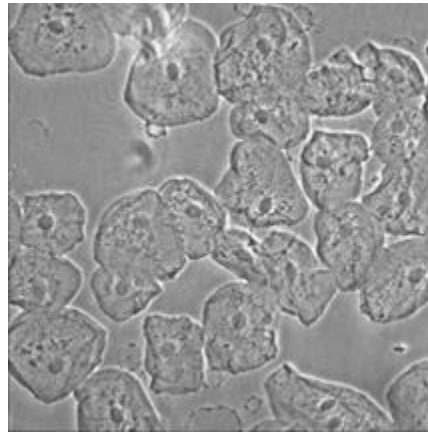
A través de una serie de experimentos, Zernike pudo comprender que la luz directa y la luz difractada se encontraban en distintas fases. Cuando el telescopio se enfocaba en la rejilla, la imagen resultante, creada a través de interferencia, se volvía invisible debido a que, a diferencia de los cambios de amplitud o de brillo, el ojo no puede detectar los cambios de fase. Zernike intuyó que las diferencias de fase contenían información acerca del objeto de interés, y se dio cuenta que necesitaría una superficie de referencia adecuada si es que quería hacer uso de esa información.

Usando la aproximación de Lord Rayleigh de grabado superficial en vidrio, la cual describía una operación para lograr pequeñas marcas sobre el vidrio con una solución diluida de ácido hidrofúrico, Zernike grabó "rayas de fase", en las cuales, al ser iluminadas, la luz directa quedaba atrapada y la luz difractada atravesaba el vidrio. El resultado fue un desplazamiento de  $90^\circ$  de la luz directa, volviéndola más oscura que un fondo uniforme de luz coherente. Cuando Zernike agregó rayas de fase a su telescopio, el patrón de rayas en la rejilla reapareció.



Zernike inmediatamente vio el potencial de aplicar este descubrimiento al mundo de la microscopía, para que los objetos transparentes pudieran ser visualizados ante el microscopio. Colocando rayas de fase en el plano focal del microscopio, similar a como lo había hecho con el telescopio, Zernike pudo visualizar objetos transparentes sin la necesidad de un colorante o teñido. Zernike publicó una descripción de este método y lo nombró “contraste de fase” [19].

Tomó otros 10 años para que las compañías comenzaran a manufacturar microscopios con la habilidad de realizar contraste de fase [20].



**Fig. 1.4.** Imagen de células bucales del ser humano obtenida a través de Microscopía de Contraste de Fase [20].

### ***1.6 Contraste de interferencia diferencial (Differential Interference Contrast)***

En la década de los 50s, los sistemas de contraste de interferencia diferencial (DIC) fueron diseñados como una técnica alternativa al contraste de fase. En el DIC, la luz polarizada es separada en dos haces, los cuales toman caminos ligeramente distintos a través de una muestra que depende de su densidad óptica.

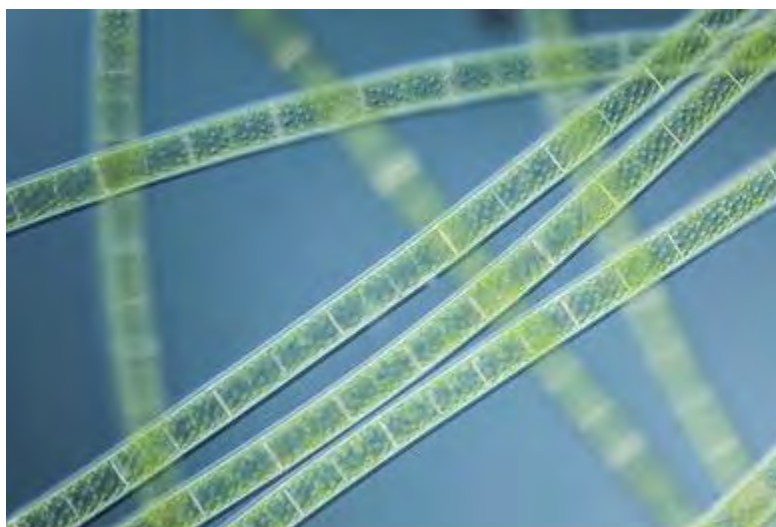
Cuando los haces son recombinados, su interferencia revela interfaces entre regiones de grosor distinto y/o índices de refracción, y genera la ilusión de imágenes tridimensionales. Con este método se pueden obtener imágenes de alta resolución – aproximadamente de 400 nm de resolución lateral – de células y organismos sin un teñido, y permite la “segmentación óptica” de muestras gruesas.

En los primeros sistemas de DIC, como el de Smith [21], uno de los prismas de Wollaston que se utilizaron como divisores de haz se encontraba en, o cerca del plano focal del objetivo, donde pudiese ser inaccesible. El físico francés Georges Nomarski, quien describió las bases teóricas del DIC, modificó la ubicación de los prismas Wollaston para que pudieran localizarse lejos de los planos focales, haciendo el sistema más práctico en cuanto a uso, ver **Fig. 1.5**.

El verdadero potencial del DIC fue apreciado cuando las videocámaras aparecieron. En 1981, dos artículos [22] [23] demostraron que, cambiando la ganancia y el *offset* de la cámara, la resolución y el contraste de las imágenes aumentaba. El DIC mejorado por video (VE-DIC por sus siglas en inglés) fue entonces utilizada en numerosos estudios del comportamiento dinámico de la célula en alta resolución. Por ejemplo, esta técnica se utilizó para descubrir el transporte rápido de las membranas vesiculares de entre 50 y 100 nanómetros de diámetro.



**Fig. 1.5.** Los componentes básicos de un arreglo experimental para microscopía de contraste de interferencia diferencial [24].



**Fig. 1.6.** Imagen de algas microscópicas obtenida a través de Contraste de Interferencia Diferencial [23].

### 1.7 Microscopía confocal (*Confocal Microscopy*)

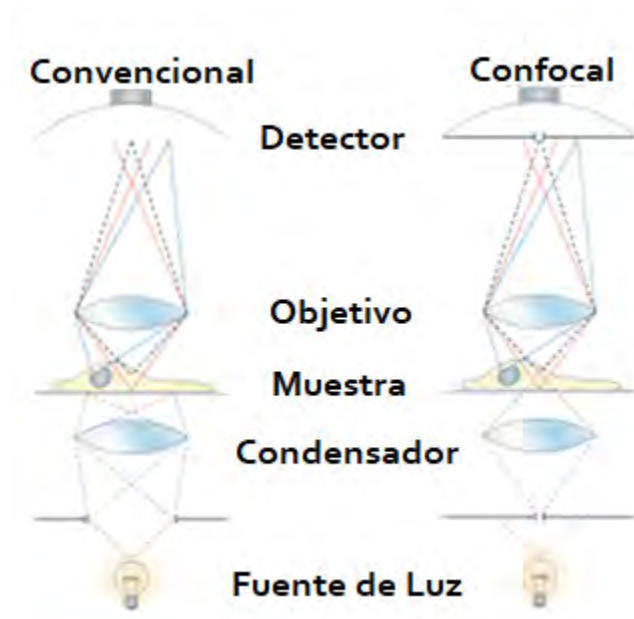
Durante la década de los 60s, los investigadores buscaron la forma de superar uno de los principales problemas del microscopio de fluorescencia: las señales y ruido de fondo. El resultado de estas investigaciones fue el microscopio confocal.

La resolución alcanzable con un microscopio convencional puede ser “negada” debido a la información fuera de foco. La microscopía confocal evita este problema restringiendo tanto el campo de iluminación, como la luz que llega al objetivo, a un solo punto en el mismo plano focal. Una imagen de la región de interés luego se construye a través de un barrido de la muestra – ya sea moviendo la muestra, o moviendo un láser. Excluyendo la luz fuera de foco, el contraste de la imagen se incrementa y pueden percibirse detalles más finos [25].

En la **Fig. 1.7** pueden compararse las construcciones habituales de un microscopio convencional y uno confocal. En el microscopio convencional (izquierda), una región grande de la muestra es iluminada por la fuente de luz y el condensador. El detector forma una imagen a partir de la luz dentro y fuera de foco. En un microscopio confocal (derecha), tanto la iluminación como la luz que puede llegar al detector son restringidas a través de dos *pinholes*. De esta forma sólo la luz dentro de foco es detectada [25].

La primera patente de un microscopio confocal le fue otorgada a Marvin Minsky – mejor conocido por su trabajo en Inteligencia Artificial – quien se encontraba trabajando en la Universidad de Harvard en 1961 [26]. Pocos años después, Mojmir Petrán, de la Universidad Charles en Checoslovaquia, construyó un microscopio compacto a través de un *pinhole*, con el cual en colaboración con David Egger de la Universidad de Yale, reportaron imágenes sin colorantes de tejido cerebral y de ganglios utilizando luz reflejada [27].

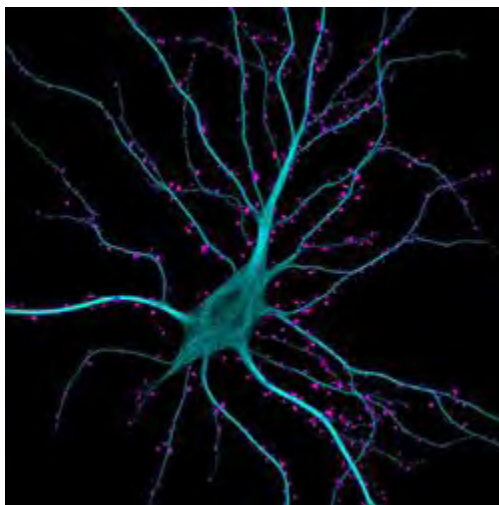
En 1981, el diseño del microscopio de Petrán fue discutido en un análisis teórico del microscopio convencional contra el microscopio confocal por Colin Sheppard y Tony Wilson, quienes propusieron la teoría de “combinar la resolución y las profundas mejoras de discriminación del microscopio confocal con la facilidad de operación del microscopio convencional” [28].



**Fig. 1.7.** Comparación estructural entre un Microscopio Convencional y un Microscopio Confocal.

Estudios consecuentes hicieron un ajuste clave en el diseño confocal: el uso de haces láser. Esto permitía un barrido más rápido y resolución más alta, pero, lo más importante, proveía la iluminación necesaria para visualizar fluorescencia. Dos artículos de 1987 [29] [30] fueron los primeros en utilizar dicho instrumento en las que serían las primeras aplicaciones clave de la microscopía confocal. En el primero, John White, William Bradshaw Amos y Michael Fordham de Cambridge, utilizaron su microscopio confocal láser para comparar las imágenes producidas por técnicas de fluorescencia y por técnicas confocales de varias células y tejido. El segundo estudio fue hecho por Gerrit van Meer en el Laboratorio Europeo de Biología Molecular en Alemania. Utilizando un microscopio confocal en conjunto con tiras de ceramida fluorescente, siguieron el proceso de transporte de espingolípidos sintetizados en células epiteliales.

Al poder visualizar imágenes claras en muestras gruesas, los microscopios confocales eliminaron la necesidad de seccionar la muestra, y permitió la visualización en condiciones más fisiológicas.



**Fig. 1.8.** Imagen de una neurona humana obtenida a través de Microscopía Confocal.

### ***1.8 FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) y FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)***

En 1972, el Laboratorio Webb le dio a la microscopía de fluorescencia un uso innovador: medir la cinemática de las reacciones químicas. Al medir las fluctuaciones de fluorescencia del Bromuro de Etidio y el ADN – donde ninguno de los dos presenta fluorescencia de manera independiente, pero en conjunto emiten un brillo naranja bajo luz ultravioleta – Magde calculó la termodinámica de la formación compleja y difusión en equilibrio, logrando así derivar formulaciones matemáticas precisas explicando sus interdependencias [31].

Esta técnica, ahora conocida como Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FCS – *Fluorescence Correlation Spectroscopy*), ha sido aplicada para medir la cinemática de reacciones químicas y biológicas, así como de flujo y difusión. Las velocidades de difusión y de flujo son medidas al detectar el movimiento estocástico de los fluorocromos que entran y salen a partir de un haz láser. Las técnicas de detección han mejorado, volviendo posible la cuantificación de la dinámica de moléculas [32]. A pesar de que la adopción de este método se vio limitada debido a la gran cantidad de medidas de calibración que requería, hoy en día pueden adquirirse módulos de FCS para microscopios confocales.

Años más tarde, una técnica similar, la Recuperación de Fluorescencia tras Fotorreducción (FRAP – *Fluorescence Recovery After Photobleaching*), les permitió a los investigadores elucidar el movimiento de proteínas dentro y entre membranas celulares con una resolución a escala micrométrica. La FRAP consiste en teñir un componente celular específico con una molécula fluorescente, ver esa célula, fotorreducir una pequeña porción de esa célula, y finalmente ver cómo se recupera la fluorescencia con el paso del tiempo.

En 1974, Bähr aplicó esta técnica a la mitad de una membrana de un eritrocito y encontraron que las proteínas de esta membrana no se difundían rápido desde la zona “normal” a la zona blanqueada [33].

En 1976, Koppel [34] realizó una comparación lado a lado de la FCS y la FRAP, y notó las ventajas y desventajas de cada técnica. Aunque la FCS puede proveer información de moléculas, el arreglo experimental era extremadamente sensible. La FRAP por su parte podía detectar elementos inmóviles en membranas celulares, aunque el proceso de fotorreducción podía dañar muestras delicadas. A pesar de esto, las dos técnicas enriquecieron y ayudaron a encontrar nuevas aplicaciones de la microscopía de fluorescencia [35].

### 1.9 Microscopía de Fluorescencia de Reflexión Interna Total (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy)

Si uno quiere visualizar lo que ocurre en una interface biológica o en la superficie de una célula es vital eliminar el fondo compuesto por todo lo que se encuentra detrás de la primera capa. Esto es exactamente lo que ocurre en la Microscopía de Fluorescencia de Reflexión Interna (TIRF – *Total Internal Reflection Microscopy*). En 1981, Daniel Axelrod [36] construyó un microscopio en el cual un haz láser golpea, en un ángulo determinado, un portaobjetos de cristal – del lado contrario a donde se encontraba la muestra. El ángulo incidente era mayor que el ángulo crítico, por lo tanto, el haz láser era reflejado de vuelta al portaobjetos. Al mismo tiempo, una pequeña parte del haz, llamada “onda evanescente” lograba penetrar cientos de nanómetros, aproximadamente 200, dentro de la muestra y podía estimular la fluorescencia en un medio biológico, ver Fig. 1.9.

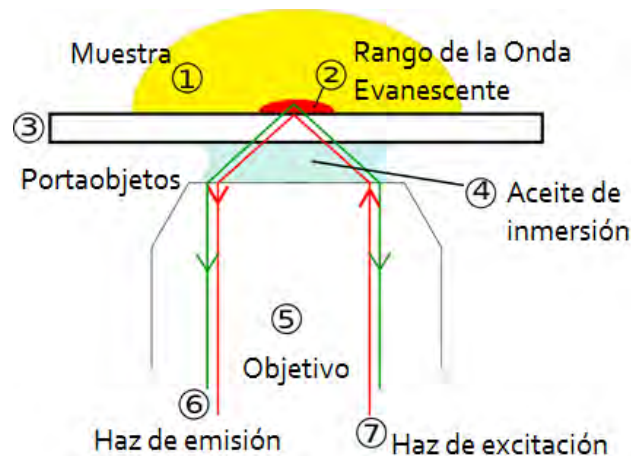
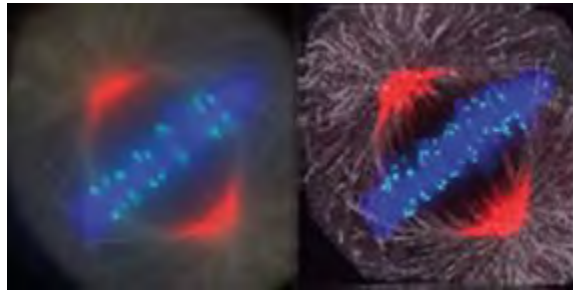


Fig. 1.9. Diagrama de un microscopio TIRF [37].

### 1.10 Microscopía de Deconvolución (*Deconvolution Microscopy*)

En 1983, Agard y Sedat [38] presentaron un método para eliminar la fluorescencia fuera de foco – asociado a factores como acromatismos, dispersiones del punto focal, etc. – y restaurar la imagen a su apariencia original: los algoritmos de deconvolución. Estos algoritmos aprovechan el conocimiento que se tiene de las propiedades ópticas del microscopio para modelar el proceso a través del cual la imagen distorsiona el objeto real. A través de varias iteraciones computacionales, basadas en el Teorema de Bayes de probabilidades condicionales, estimaciones del objeto se agregan a la ecuación y se realiza una comparación entre el resultado de la iteración y la imagen obtenida con el fin de mejorarla, hasta que las propiedades verdaderas, o una aproximación muy cercana, son obtenidas. De esta forma se pudo obtener la primera imagen de alta resolución de la estructura y la organización de las glándulas salivales.



**Fig. 1.10.** Imagen de una célula HeLa en metafase obtenida por microscopía de deconvolución. A la izquierda se tiene la imagen antes del algoritmo de deconvolución [39].

### 1.11 Microscopía de dos fotones (*Two Photon Microscopy*)

Para visualizar fenómenos que ocurren en células profundas de tejido, reduciendo el daño fotónico hacia la muestra, se buscó manipular la presencia de brillo fuera de foco, el cual difumina las imágenes obtenidas a través de microscopía de epifluorescencia. En la microscopía confocal realizada con láser, el fondo fuera de foco se elimina con un *pinhole*, pero la gran cantidad de luz de excitación significa que la luz dispersada limita cuánto de ese fondo puede ser reducido. En la microscopía de dos fotones, la excitación es confinada al volumen focal, por lo que la detección de fluorescencia es menos sensible a problemas de dispersión de luz.

La absorción de dos fotones es un viejo concepto de la óptica cuántica que fue descrito por primera vez por Maria Göppert en su tesis doctoral de 1931 [40]. Treinta años después, Kaiser y Garret observaron este fenómeno en cristales [41].

La excitación de dos fotones es resultado de la casi simultánea absorción de dos fotones por una molécula. La longitud de onda de la luz de excitación debe ser el doble de la requerida para la excitación de un solo fotón debido a que la energía del fotón es inversamente proporcional a la longitud de onda. En la microscopía de dos fotones, un haz

láser es enfocado en la muestra para que así se incremente la probabilidad de que haya fluorescencia, y el láser escanea el campo de vista para formar la imagen. Esto se volvió posible en 1990, cuando los láseres de *mode-locking* capaces de entregar densidades fotónicas millones de veces mayores a las de los láseres convencionales, con pulsos ultracortos de duraciones en el rango de los femtosegundos. Denk, Strickler y Webb [42] fueron los primeros en utilizar este método para visualizar cromosomas en cultivos de células vivas. En un estudio subsecuente [43], Denk adaptó este método para la visualización de neuronas *in situ*, y el potencial entero de esta técnica se dio a conocer cuando Svoboda la utilizó para medir la dinámica piramidal de las neuronas en un cerebro intacto de rata [44].

Al confinar la excitación al volumen focal, los microscopios de barrido por láser de fluorescencia permiten la asignación correcta de fotones a la posición espacial de la cual se originaron. El uso de longitudes de onda grandes y la sensibilidad reducida de dispersión asociada con el confinamiento de excitación provee imágenes claras hasta de diez veces mayor profundidad que las de un microscopio confocal convencional. Además, la excitación de dos fotones reduce el fotorreducción y el daño por exposición a la luz, volviéndola ideal para visualizar células vivas enterradas en lo profundo de órganos intactos [45].

### ***1.12 Microscopía de hoja de luz (Light Sheet Microscopy)***

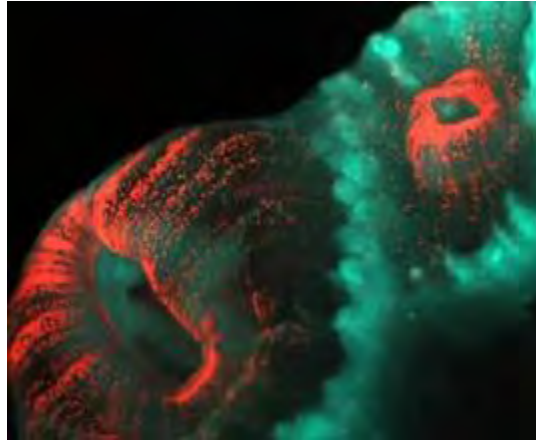
La idea de iluminar muestras lateralmente fue descrita por primera vez en 1903, pero fue hasta 1993 que Voie desarrolló este principio para desarrollar fluorescencia de seccionamiento óptico de plano ortogonal (OPFOS – *Orthogonal-Plane Fluorescence Optical Sectioning*). En esta aproximación, la muestra es seccionada ópticamente por una delgada hoja de luz producida por lentes cilíndricas. La hoja de luz es proyectada a uno de los planos de la muestra, perpendicularmente al eje de detección o visualización. Debido a que sólo uno de los planos de la muestra es iluminado, la luz no puede ser emitida por regiones fuera del plano focal y, por lo tanto, no hay componentes fuera de foco en la imagen [46].

A pesar de que este método ofrecía un gran potencial para visualizar muestras grandes a detalle, no fue desarrollado comercialmente y sólo fue utilizado por equipos de investigación especializada, siendo una de las principales investigaciones la realizada en 2002 por Fuchs, quién pudo visualizar bacterias acuáticas en su entorno natural [47].

Sin embargo, en 2004 Stelzer y su equipo de trabajo lograron desarrollar una aplicación a la que denominaron microscopía por iluminación de plano selectivo (SPIM – *Selective Plane Illumination Microscopy*), con la cual se pueden visualizar imágenes en 3D de alta resolución con una profundidad de penetración impresionante [48]. Este método consiste en iluminar el plano focal desde un costado. Sólo una delgada sección de la muestra es iluminada,



minimizando el daño a la muestra y proporcionando un seccionamiento óptico con una relación señal ruido más eficiente en comparación con la obtenida en microscopía de epifluorescencia. Actualmente, el equipo de Stelzer se encuentra trabajando con el fabricante Carl Zeiss para desarrollar una aplicación comercial de este tipo de microscopía [49].



**Fig. 1.11.** Imagen de un coral obtenida a través de Microscopía de Hoja de Luz [48].

### ***1.13 Microscopía de campo cercano (Near-field Scanning Optical Microscopy)***

En 1993, Eric Betzig y Robert Chichester reportaron la primera visualización repetitiva de fluoróforos a temperatura ambiente con una nueva técnica denominada microscopía de barrido óptico en campo cercano (NSOM, también conocida como SNOM – *Near-field Scanning Optical Miscroscopy*) [50]. Este tipo de microscopía explota las propiedades de las ondas evanescentes. La luz (láser) de excitación se enfoca a través de una apertura de diámetro menor al de la longitud de onda de excitación, resultando en un campo evanescente (o campo cercano) en el lado extremo de la apertura. Cuando la muestra es barrida a una pequeña distancia de la apertura, la resolución óptica de la luz transmitida o reflejada está limitada sólo por el diámetro de la apertura.

Los principales componentes de un arreglo experimental de NSOM son una fuente de luz, un mecanismo de retroalimentación, la punta de barrido, el detector y un motor piezoeléctrico para las traslaciones. La fuente de luz usualmente es un láser enfocado en una fibra óptica a través de un polarizador, un divisor de haz y un acoplador [51].

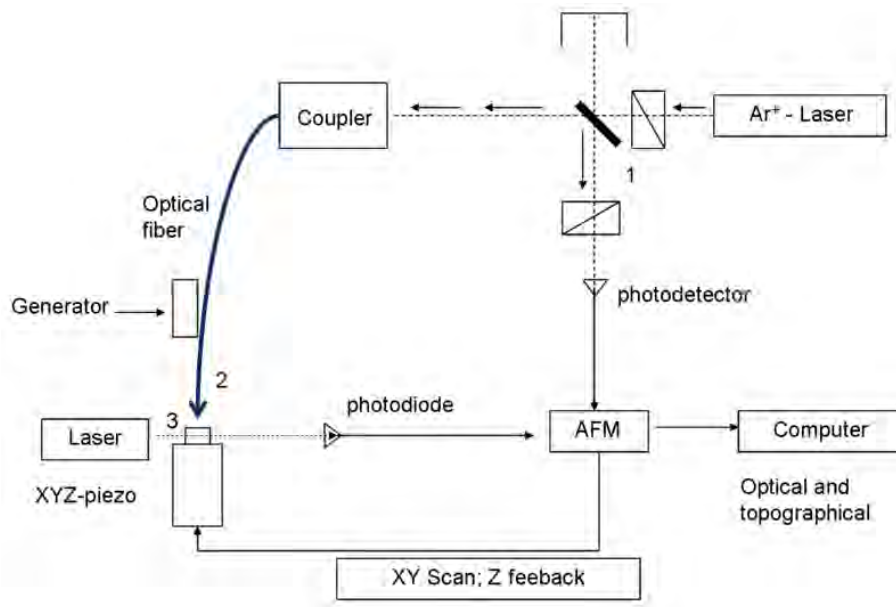


Fig. 1.12. Diagrama a bloques de un arreglo experimental de NSOM [51].

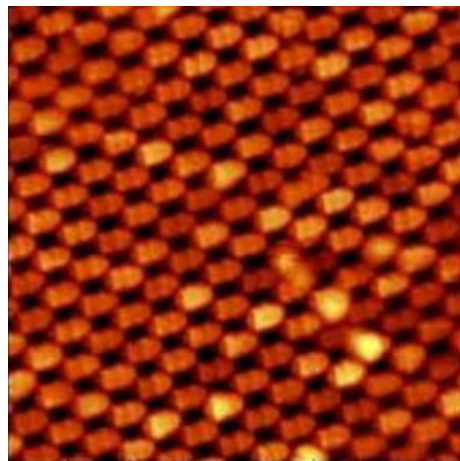


Fig. 1.13. Imagen de un patrón triangular en PMMA de  $5 \times 5 \mu\text{m}$  obtenida a través de Microscopía de Campo Cercano [50].

### 1.14 Rompiendo el límite de difracción

Por casi todo el siglo XX, se creyó que la microscopía de campo lejano no podía resolver objetos y distancias menores a los 150-200 nm. Esto debido a que la luz es difractada cuando pasa a través de distintos medios, por lo que la luz que emana de un punto es detectada como si emergiera de un volumen más grande. La microscopía, se decía entonces, estaba "limitada por la difracción". A pesar de esto, muchos procesos celulares ocurrían a estas distancias limitadas por la difracción, desde cientos hasta unos cuantos

nanómetros. Para poder visualizar estos procesos, un tipo de microscopía capaz de resolver estas distancias era necesaria. Se volvió necesario “romper” el límite de difracción.

Tras una serie de estudios que llegaron a la máxima resolución teórica, Hell demostró, primero de manera teórica y luego experimental, que el microscopio de vaciado por emisión estimulada (STED – *Stimulated Emission Depletion*) podía romper el límite de difracción. Para lograr esto, el punto focal de excitación era reducido a un tamaño minúsculo al arrancarle todos los fluoróforos en sus bordes a través de emisión estimulada con un haz STED en forma de dona de luz roja. Este pequeño punto es barrido sobre la muestra para generar una imagen por debajo de la difracción [52]. En la primera implementación del STED, se visualizaron levaduras y bacterias, a una escala aproximada de 100 nm [53].

Finalmente, al explotar la sabida habilidad de localizar moléculas simples a precisión nanométrica, varias aproximaciones de este tipo fueron desarrolladas para alcanzar resoluciones por debajo del límite de difracción. Los pioneros de estos métodos fueron Eric Betzig y Harald Hess para la microscopía de localización foto-activada (PALM – *Photoactivated Localization Microscopy*) [54]; Xiaowei Zhuang para la microscopía de reconstrucción estocástica óptica (STORM – *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) [55]; y Samuel Hess para la microscopía de fluorescencia por localización foto-activada (FPALM – *Fluorescence Photoactivated Localization Microscopy*) [56]. La total extensión de las aplicaciones de este tipo de microscopías aún se encuentra en desarrollo.

### ***Referencias del capítulo:***

- [1] R. S. Whipple, The History of the Microscope: Compiled From Original Instruments and Documents, Up To the Introduction of the Achromatic Microscope, *Nature* **131** 219-221 (1933)
- [2] R. Hooke, *Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies, Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon*, James Allestry, Inglaterra (1664)
- [3] A. V. Leeuwenhoek. *The Selected Works of Antony van Leeuwenhoek Containing His Microscopical Discoveries in Many of the Works of Nature*, Arno Press, Inglaterra (1977)
- [4] C. K. Rosenthal, *Milestones in Light Microscopy: Milestone 1, (1595) Invention of the Microscope*, Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1938 (2009)
- [5] J. V. Gerlach, *Mikroskopische Studien aus dem Gebiet der menschlichen Morphologie*, Enke, Alemania (1858)
- [6] G. Clark, F. H. Kasten, *History of Staining*, Williams and Wilkins, 3ra Edición, EUA, (1983)

- [7] J. F. W. Herschel. On a Case of Superficial Colour Presented by Homogeneous Liquid Internally Colourless, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **135** 143-145 (1845)
- [8] G. G. Stokes. On the Change of Refrangibility of Light, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **142** 463-562 (1852)
- [9] A. Heinrichs. Milestones in Light Microscopy: Milestone 2, Stains and fluorescent dyes, Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1939 (2009)
- [10] G. B. Airy. On the diffraction of an object-glass with circular apertura. *Trans. Cambridge Phil. Soc.* **5** 283-291 (1835)
- [11] F. W. J. Olver. Numerical methods. NIST Handbook of Mathematical Functions. Cambridge University Press (2010)
- [12] E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **9** 413-418 (1873)
- [13] N. Gray. Milestones in Light Microscopy: Milestone 3, Knowing the Limit. Nature Publishing, doi:1038/ncb1940 (2009)
- [14] O. Heimstädt. Das Fluoreszenzmikroskop. *Z. Wiss. Mikrosk.* **28** 330-337 (1911)
- [15] P. Eilenger. Mikroskopische Beobachtungen an lebenden Organen mit Demonstrationen (Intravitalmikroskopie). *Arch. Exp. Pathol. Phar.* **147** 63 (1929)
- [16] J. S. Ploem. The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light. *Z. Wiss. Mikrosk.* **68** 129-142 (1967)
- [17] N. Rusk. Milestones in Light Microscopy: Milestone 4, The fluorescence microscope. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1941 (2009)
- [18] F. Zernike. Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung. *Z. technische Physik.* **16** 454-457 (1935)
- [19] F. Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica.* **9** 974-986 (1942)
- [20] N. Blow. Milestones in Light Microscopy: Milestone 5, Finding phase. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1942 (2009)
- [21] F. H. Smith. Microscopic interferometry. *Research (London)* **8** 385-395 (1955)
- [22] R. Allen. Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: a new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motil. Cytoskel* **1** 291-302 (1981)
- [23] S. Inoué. Video image processing greatly enhances contrast, quality, and speed in polarization-based microscopy. *J. Cell Biol.* **89** 346-356 (1981)

- [24] C. K. Rosenthal. Milestones in Light Microscopy: Milestone 8, Contrast by interference. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1943 (2009)
- [25] A. Schuldt. Milestones in Light Microscopy: Milestone 9, Seeing the Wood for the trees. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1946 (2009)
- [26] M. Minsky. Microscopy Apparatus. Patente No. 3,013,467. E.U.A. (1961)
- [27] M. Petrá. Tandem-scanning reflected-light microscope. J. Opt. Soc. Am. **58** 661-664 (1968)
- [28] C. J. Sheppard. The theory of the direct-view confocal microscope. J. Microsc. **124** 107-117 (1981)
- [29] J. G. White. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. J. Cell Biol. **105** 41-48 (1987)
- [30] G. Van Meer. Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin–Darby canine kidney) cells. J. Cell Biol. **105** 1623-1635 (1987)
- [31] D. Magde. Thermodynamic fluctuations in a reacting system — measurement by fluorescence correlation spectroscopy. Phys. Rev. Lett. **29** 705-708 (1972)
- [32] R. Rigler. Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy. Bioscience **3** 180-183 (1990)
- [33] W. Bähr. A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes. Biochim. Biophys. Acta **367** 282-294 (1974)
- [34] E. Koppel. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. Biophys. J. **16** 1315-1329 (1976)
- [35] E. J. Chenette. Milestones in Light Microscopy: Milestone 10, FCS and FRAP: illuminating cellular processes. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1945 (2009)
- [36] D. Axelrod. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. J. Cell Biol. **89** 141-145 (1981)
- [37] S. Tonzani. Milestones in Light Microscopy: Milestone 13, TIRF: imaging at the cellular edge. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1933 (2009)
- [38] D. A. Agard. Three-dimensional architecture of a polytene nucleus. Nature. **302** 676-681 (1983)
- [39] K. Whalley. Milestones in Light Microscopy: Milestone 14, Imaging without the blur. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1949 (2009)
- [40] M. Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. Ann. Phys. **9** 273-294 (1931)
- [41] W. Kaiser. Two-photon excitation in  $\text{CaF}_2: \text{Eu}^{2+}$ . Phys. Rev. Lett. **7** 229-231 (1961)

- [42] W. Denk. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. **248** 73-76 (1990)
- [43] W. Denk. Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. *Neurosci. Methods*. **54** 151-162 (1994)
- [44] K. Svoboda. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*. **385** 161-165 (1997)
- [45] N. Le Bot. Milestones in Light Microscopy: Milestone 15, It takes two photons to tango. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1950 (2009)
- [46] A. H. Voie. rthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *J. Microsc.* **170** 229-236 (1993)
- [47] E. Fuchs. Thin laser light sheet microscope for microbial oceanography. *Opt. Express*. **10** 145-154 (2002)
- [48] E. H. Stelzer. Fundamental reduction of the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy. *Opt. Comm.* **111** 536-547 (1994)
- [49] R. David. Milestones in Light Microscopy: Milestone 16. Seeing the light, perpendicularly. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1951 (2009)
- [50] E. Betzig. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science*. **262** 1422-1425 (1993)
- [51] D. Evanko. Milestones in Light Microscopy: Milestone 17. Single molecules in the dark. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1952 (2009)
- [52] S. Hell. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **19** 780-782 (1994)
- [53] N. De Souza. Milestones in Light Microscopy: Milestone 21. Light microscopy at the limit. Nature Publishing, doi:10.1038/ncb1954 (2009)
- [54] E. Betzig. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*. **313** 1642-1645 (2006)
- [55] X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*. **3** 793-796 (2006)
- [56] S. Hess. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* **91** 4258-4272 (2006)

## Capítulo 2: Fundamentos Teóricos

Todo dispositivo debe contar con una fundamentación teórica y experimental, cada una siendo tan importante como la otra. Para el desarrollo de este trabajo se hizo uso de varios conceptos y dispositivos que en conjunto definen las capacidades del Nanoscopio implementado. Para comprender y analizar adecuadamente los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación, es importante conocer la parte teórica que los respalda.

### 2.1 Radiación Electromagnética

Desde el punto de vista clásico, la radiación electromagnética está compuesta de ondas electromagnéticas, las cuales son oscilaciones sincronizadas de campos magnéticos y eléctricos que se propagan a la velocidad de la luz en el vacío. Las oscilaciones de estos dos campos son perpendiculares una de la otra y perpendiculares a la dirección de la energía y de la propagación de la onda [1].

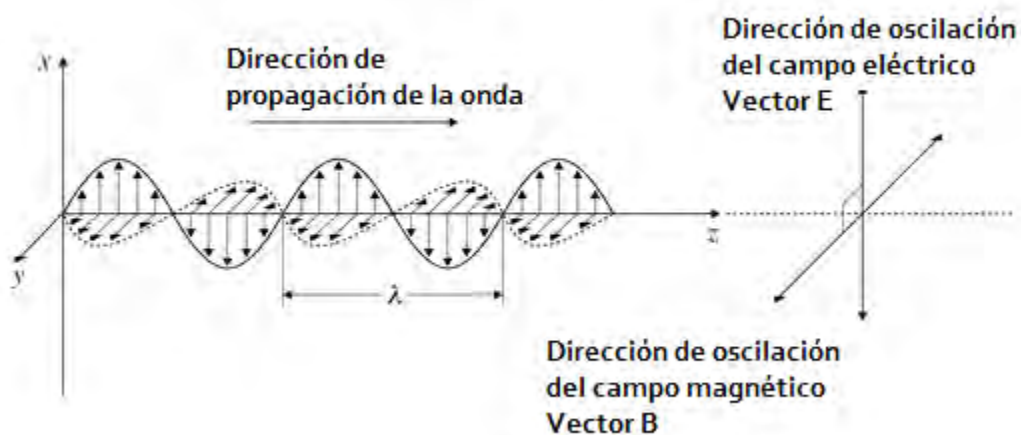


Fig. 2.1. Representación clásica de una onda electromagnética.

La onda viaja en una dirección fija conocida como dirección de propagación. La onda viaja a la velocidad de luz, usualmente representada como:

$$c = 3.00 \times 10^8 \text{ m/s}$$

(2.1)

Los campos varían de manera sinusoidal y lo hacen al mismo tiempo, a esto se le conoce como fase. Cada campo tiene su magnitud máxima, conocida como amplitud. Ambos campos están caracterizados por una longitud de onda  $\lambda$ , la cual es igual a la distancia entre dos crestas de la onda. Como la onda tiene una longitud de onda particular y se mueve a una velocidad conocida, es fácil calcular el número de veces que una longitud de onda

pasará por un punto fijo. Ese número se conoce como frecuencia  $f$  de una onda y está dada por:

$$f = \frac{c}{\lambda}$$

(2.2)

Las ondas electromagnéticas de distintas longitudes de onda tienen diversas propiedades. Colectivamente forman el espectro electromagnético.

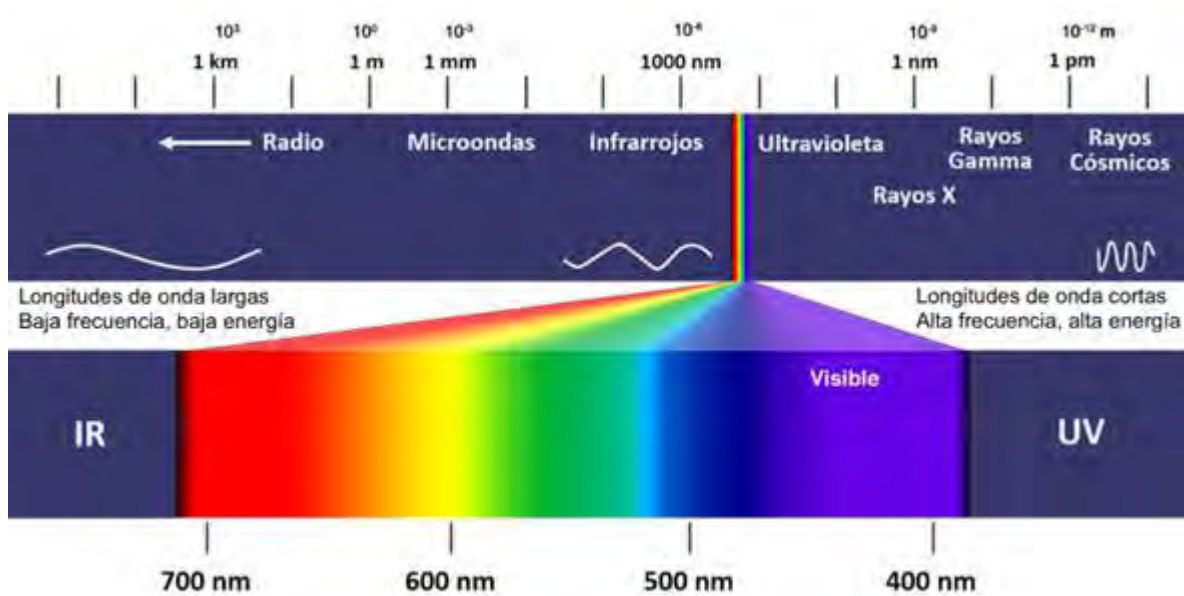


Fig. 2.2. Espectro electromagnético [2].

Las partes del espectro con longitudes de onda menores a las de la luz visible destacan por su alto nivel de energía y su potencial de generar daño biológico. Estas incluyen las radiaciones gamma, los rayos X y la región Ultravioleta. Al otro lado de la luz visible, donde las longitudes de onda son mayores, se encuentran la región infrarroja, las microondas y las ondas de radio.

El ojo humano detecta las distintas frecuencias de la luz como distintos colores. La luz de longitudes de onda de entre 400 y 480 nm es detectada como azul-violeta; entre 480 y 560 nm como verde; entre 560 y 600 nm como amarillo y finalmente entre 600 y 750 nm como rojo [2].



## 2.1 Haz de Luz

Es un modelo idealizado de luz, obtenido al elegir una línea perpendicular a los frentes de onda de la luz, y que apunta en la dirección en la que fluye la energía [3].

Un haz de luz es una línea, recta o curva, perpendicular a los frentes de onda de la luz; su tangente es paralela al vector de onda. La óptica geométrica describe la propagación de la luz en términos de haces. Las asunciones de la óptica geométrica establecen que los haces de luz [4]:

- Se propagan en línea recta al viajar en un medio homogéneo.
- Se doblan, y en circunstancias particulares se pueden dividir en dos, en la intersección de dos medios distintos.
- Siguen caminos curvos en un medio cuyo índice de refracción cambia.
- Pueden ser absorbidos o reflejados.

Una definición un poco más rigurosa de un haz de luz cumple con el principio de Fermat, el cual establece que el camino tomado entre dos puntos por un haz de luz es el camino que puede ser recorrido en el menor tiempo [5].

## 2.2 Interacciones de un haz de luz con una superficie

Un haz incidente es un haz de luz que golpea una superficie suficientemente reflejante, o no absorbente. El ángulo formado entre este haz y la normal de la superficie es conocido como ángulo de incidencia.

Un haz reflejado correspondiente a un haz incidente, es el haz que representa a la luz reflejada por la superficie. El ángulo formado entre este haz y la normal de la superficie es conocido como ángulo de reflexión. Un haz refractado correspondiente a un haz incidente, es el haz que representa a la luz transmitida desde la superficie. El ángulo formado entre este haz y la normal de la superficie es conocido como ángulo de refracción [6].

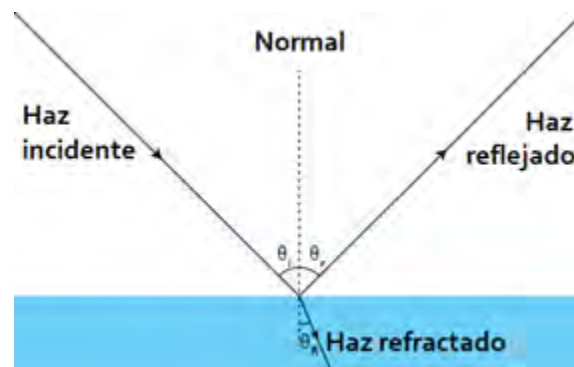


Fig. 2.3. Interacciones de un haz de luz con una superficie.

## 2.3 Reflexión

En la reflexión, la luz incide sobre una superficie y es regresada en dirección hacia el medio del que provino. Un espejo se considera como una superficie con alta reflectividad. La luz incidente en un espejo no puede penetrar muy profundamente sobre la superficie y es reflejada casi por completo. Sin embargo, un poco de esa luz será absorbida por la superficie; esta absorción depende por completo de la longitud de onda de la luz incidente [7].

La **Figura 2.4** muestra un haz de luz incidente a partir de cualquier punto P sobre un espejo en el punto A, el cual es llamado *punto de incidencia*, y, tras ser reflejado, pasa a través de un punto P'. La línea perpendicular al espejo en A es conocida como *normal* y los ángulos formados entre el haz de incidencia y el de reflexión con la normal, se conocen como *ángulo de incidencia*  $\theta_i$  y *ángulo de reflexión*  $\theta_R$ , respectivamente. A partir de estas observaciones, se puede enunciar la Ley de la Reflexión.

- El haz reflejado, el haz incidente y la normal se encuentran en el mismo plano.
- El ángulo de reflexión es igual al ángulo de incidencia.  
$$\theta_i = \theta_R$$
- El haz reflejado y el haz incidente se encuentran en los lados opuestos a la normal.

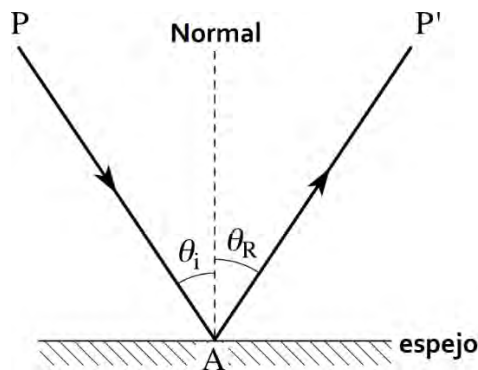
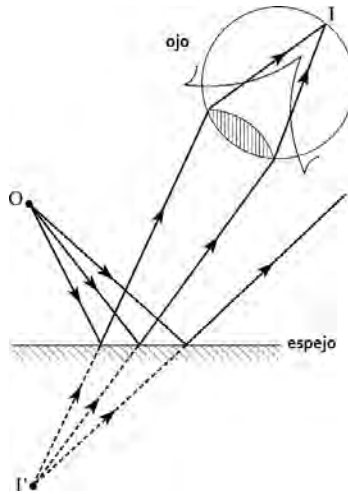


Fig. 2.4. Haz de luz reflejado por un espejo.

## 2.4 Formación de imágenes en un espejo plano

Arreglos de lentes y espejos usualmente son utilizados para hacer que un conjunto de haces de luz que divergen en un punto, converjan en otro. Este proceso puede apreciarse en la **Figura 2.5**, en donde los haces divergentes desde un objeto puntual O son reflejados por un espejo plano y luego convergen en un punto I del ojo humano. Bajo estas circunstancias se dice que se tiene una *imagen real* del objeto en el punto I.

Ante el observador de la **Figura 2.5**, el objeto O aparentemente se encontraría “dentro” del espejo en un punto I'. Debido a que los haces generados por el objeto son reflejados en el espejo, decimos que en ese punto se tiene una *imagen virtual* de O en el punto I' [8].



**Fig. 2.5.** Formación de una imagen real y una imagen virtual de un objeto puntual.

Se asociará un sistema cartesiano al espejo, con los ejes "x" y "y" en el plano del espejo y el eje "z" a la normal con respecto al espejo. Si las coordenadas del objeto en el punto O son  $(X, Y, Z)$ , entonces las coordenadas del punto N, en donde la normal de O se encuentra con el espejo, serían  $(X, Y, 0)$ , y como la longitud de NI' es Z, las coordenadas del punto I' de la imagen virtual serán  $(X, Y, -Z)$ .

Estas coordenadas no sólo son válidas para un objeto puntual. Para un objeto extendido, este sistema también aplica. Cada uno de los puntos de este objeto tiene una imagen virtual que le corresponde dentro del espejo, creando de esta manera una imagen del mismo tamaño que la original, pero con un cambio significativo: la imagen se encuentra al revés. Al mismo tiempo, se dice que la imagen se encuentra erecta, ya que el espejo no cambia las direcciones de "arriba y abajo".

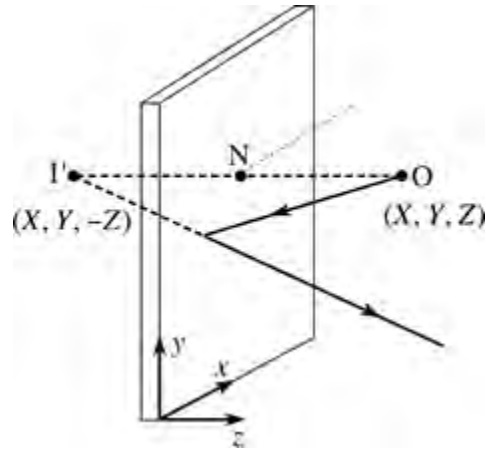


Fig. 2.6. Representación en un sistema cartesiano de la formación de imágenes [8].

### 2.5 Láser de Semiconductor

Son láseres basados en un medio de ganancia semiconductor, donde la ganancia óptica se alcanza a través de emisión estimulada en una transición interbanda bajo condiciones de alta densidad de portadores en la banda de conducción (inversión de portadores) [9].

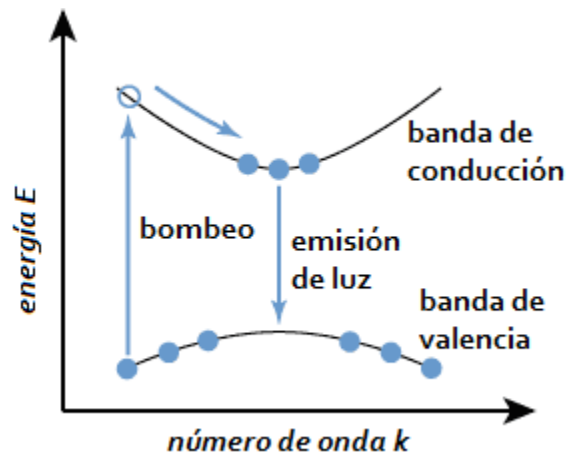


Fig. 2.7. Origen físico de la ganancia en un semiconductor.

Sin el bombeo, la mayoría de los electrones se encuentra en la banda de valencia. Un haz de bombeo con energía ligeramente por encima de la de la banda prohibida puede excitar electrones a un estado más alto en la banda de conducción, de donde decaen rápidamente a los estados menos energéticos de la banda de conducción. Los huecos generados en la banda de valencia se mueven al estado más energético de la banda de valencia. Los electrones en la banda de conducción se pueden recombinar con estos huecos, emitiendo fotones con energía similar a la energía de la banda prohibida. Este proceso puede ser

estimulado por fotones de energía adecuada, es decir, fotones con la energía suficiente para realizar este proceso [10].

Entre los láseres de semiconductores se encuentran los diodos láser, los láseres de bombeo óptico y los láseres de cascada cuántica.

### 2.5.1 Diodo Láser (LD – *Laser Diode*)

Son un tipo de láser de semiconductor bombeados eléctricamente en los que la ganancia se genera por una corriente eléctrica fluctuando a través de una unión p-n o una estructura p-i-n. En este tipo de estructuras, los electrones y los huecos se pueden recombinar, liberando energía en forma de fotones. Este proceso es espontáneo, pero también puede ser estimulado por fotones incidentes; teniendo una amplificación y una retroalimentación óptica, se forma un oscilador láser y se alcanza la oscilación láser [11].

La mayoría de los diodos láser se construyen como láseres de borde emisor, donde el resonador láser se forma por varias capas de la oblea del semiconductor. Usualmente están basados en heteroestructuras dobles, lo que restringe a los portadores generados a una región angosta y al mismo tiempo funciona como una guía de onda para el campo óptico. El flujo de corriente se encuentra restringido dentro de la misma región. Estos arreglos usualmente tienen como resultado una baja potencia umbral de bombeo y una alta eficiencia [12].



**Fig. 2.8.** Esquemático de un diodo láser de baja potencia de borde emisor. No se muestran las estructuras electrónicas.

La longitud de onda de emisión de un diodo láser se encuentra determinada esencialmente por la banda prohibida del material semiconductor. Un fotón de energía igual a la energía de recombinación puede generar recombinación a través de emisión estimulada. Esto genera a su vez un fotón de la misma frecuencia, polarización y fase, viajando en la misma dirección que el primer fotón. Por lo que si se requiere un fotón de 600 nm para alcanzar la banda prohibida del material, la emisión del diodo láser será de 600 nm – de manera ideal.

### 2.5.2 Diodos Láser de Nitruro de Galio-Indio (InGaN)

Este es un material semiconductor formado por Nitruro de Galio (GaN) y Nitruro de Indio (InN). Es un semiconductor de banda directa del grupo ternario III/V. Su banda prohibida puede ser ajustada al variar la cantidad de Indio en la composición del material [13].

El Nitruro de Galio-Indio es la capa emisora de luz más utilizada en los Diodos Emisores de Luz (LED – *Light Emitting Diode*) y los Diodos Láser azules y verdes, por lo general depositada en sustratos transparentes para mejorar su emisión. Tiene alta capacidad térmica y su sensibilidad a radiación ionizante es baja, por lo que también es un gran candidato para la fabricación de dispositivos fotovoltaicos solares y satélites.

La emisión de luz proveniente de este material tiende a atenuarse debido a la gran cantidad de defectos que presenta el Nitruro de Galio, afectando su recombinación no radiativa. Sin embargo, este tipo de atenuaciones se ven reducidas al limitarse a emitir en regiones verde, azul y ultravioleta [14].

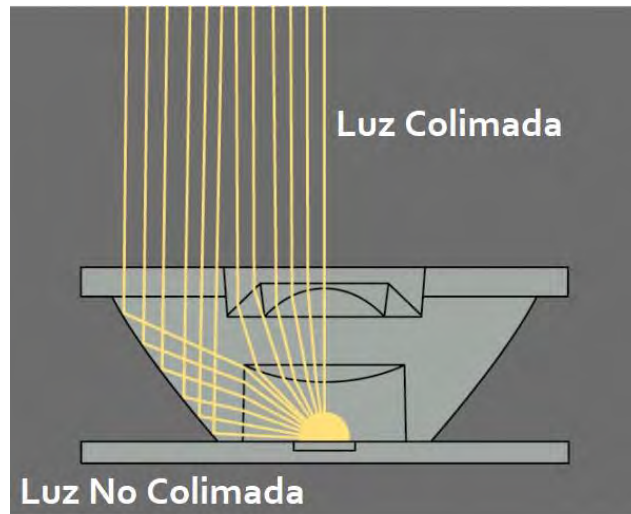
Las longitudes de onda en las que emite pueden variarse ajustando la relación entre el GaN/InN [15]:

- Para el ultravioleta cercano (390 nm): 0.02 In / 0.98 Ga.
- Para el azul-violeta (405 nm): 0.2 In / 0.8 Ga.
- Para el azul (440 nm): 0.3 In / 0.7 Ga.

## 2.6 Luz Colimada

Es luz cuyos haces son paralelos, por lo que se desvían en cantidades mínimas al propagarse. Un haz perfectamente colimado, en teoría, no se desvía a la distancia. Sin embargo, un haz con estas características es imposible de generarse, debido a la difracción [16].

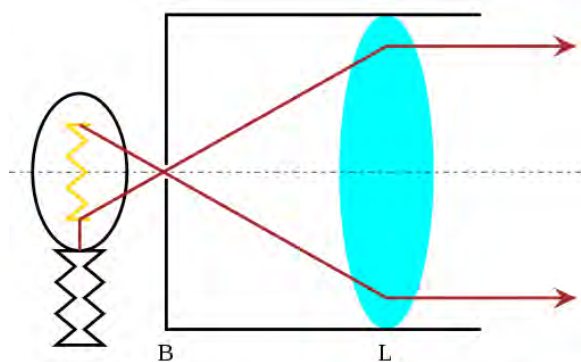
La luz puede ser colimada a través de varios procesos, como, por ejemplo, utilizando un colimador. La luz colimada se dice que está enfocada en el infinito. Por lo tanto, mientras la distancia se incrementa desde la fuente, los haces esféricos comienzan a “aplanarse” hasta convertirse en ondas planas, las cuales están colimadas.



**Fig. 2.9.** Representación de haces de luz colimados y no colimados [17].

### 2.6.1 Colimador óptico

Generalmente están compuestos por un espejo curvado o lentes con algún tipo de fuente de luz o imagen en el foco. Estos pueden utilizarse para replicar un blanco enfocado en el infinito.



**Fig. 2.10.** Ejemplo de un colimador óptico con una fuente de luz, una apertura (B) y una lente positiva (L).

Los colimadores ópticos pueden utilizarse para calibrar otros dispositivos ópticos, para verificar si todos los elementos se encuentran alineados en el foco deseado, o para alinear dos o más dispositivos como binoculares o mirillas láser.

### 2.7 Divisor de haz

Es un dispositivo óptico que puede dividir un haz incidente de luz en dos o más haces de luz, los cuales pueden o no tener la misma potencia óptica.

Cualquier espejo parcialmente reflejante puede ser utilizado para dividir haces. El ángulo de incidencia determina la separación angular de los haces de salida, por lo general es de  $45^\circ$ . Según el tipo de aplicación, este ángulo puede ser mayor o menor [18].

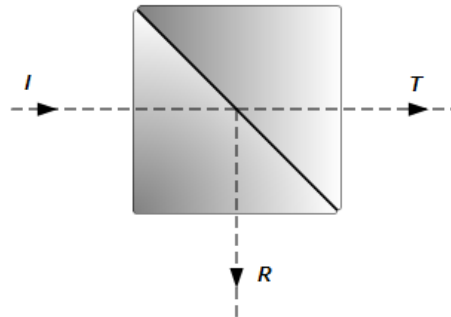


Fig. 2.11. Diseño esquemático de un divisor de haz.  $I$  es la luz incidente.  $T$  es la luz transmitida.  $R$  es la luz reflejada [18].

## 2.8 Objetivo de Microscopio

La manera más sencilla de definir un objetivo de microscopio es como una lente magnificadora de gran capacidad, con una distancia focal muy pequeña. El objetivo se acerca a la muestra para que la luz proveniente de ella encuentre su foco en las lentes de visualización del microscopio. Usualmente, un objetivo es un cilindro que contiene un arreglo de lentes. Los objetivos tienen dos parámetros fundamentales: La magnificación y apertura numérica. La magnificación indica qué tanto se “agrandará” la imagen con respecto a la muestra original; mientras que la apertura numérica indica qué tanta luz puede pasar a través del objetivo [19].

La Apertura Numérica está dada por la expresión:

$$NA = n x \sin(\mu) \text{ o } NA = n x \sin(\alpha)$$

(2.3)

donde

$n$  representa el índice de refracción del medio entre la lente frontal del objetivo y la muestra.

$\mu$  o  $\alpha$  es la mitad de la apertura angular del objetivo.

La apertura numérica de un objetivo de microscopio es una medida de su habilidad de coleccionar luz y resolver detalles finos a una distancia determinada.

El objetivo de un microscopio es quizá el componente más importante de todos, ya que es el responsable de la formación primaria de una imagen. Juega un papel preponderante en determinar la calidad de las imágenes que puede producir un microscopio. Los objetivos



también son los que determinan la magnificación de una muestra en particular y la resolución a la que será observada.

A su vez, el objetivo es el componente más difícil de diseñar y ensamblar, ya que es el primer elemento con el que se encuentra la luz en su trayecto hacia la muestra.

Existen una amplia variedad de diseños de objetivos, los cuales proveen distintas características ópticas bajo distintas condiciones de iluminación, entre otros factores.

#### **2.8.1 Objetivos Acromáticos:**

Son los más comunes y más baratos. Corrigen aberraciones cromáticas axiales para dos longitudes de onda: 486 y 656 nm. Esto se logra haciendo que compartan un mismo punto focal. Corrigen aberraciones esféricas para 546 nm. Producen un halo de color magenta (comúnmente llamado color residual) con longitudes de onda cercanas al verde, por lo que se recomienda usar un filtro. No cuentan con correcciones de campo plano (*flat-field*).

#### **2.8.2 Objetivos de Fluorita o Semi-Apocromáticos:**

Se producen con formulaciones avanzadas de vidrio, las cuales mejoran la corrección de aberraciones ópticas. Así como en los acromáticos, los de fluorita corrigen cromáticamente al rojo y al azul. Corrigen las aberraciones esféricas a través de un triplete de lentes adicional, logrando corregir dos o tres colores en vez de solo uno. Se pueden fabricar con una apertura numérica mucho mayor, logrando imágenes más brillantes. Tienen mejor resolución gracias a su alto grado de contraste, volviéndolos ideales para su utilización con luz blanca.

#### **2.8.3 Objetivos Apocromáticos:**

Son muy similares a los objetivos de fluorita. Su diferencia radica en el grosor y la curvatura de las lentes utilizadas para su construcción. Son los objetivos que presentan el más alto grado de corrección actualmente, haciéndolos los más sofisticados y más caros en el mercado debido a su complejidad de fabricación. Están corregidos cromáticamente para el rojo, verde y azul. Cuentan con otro triplete de lentes para corregir la aberración esférica de más colores. Debido a su alto nivel de corrección, tienen hasta un 40% más de apertura numérica en comparación con los objetivos de fluorita.

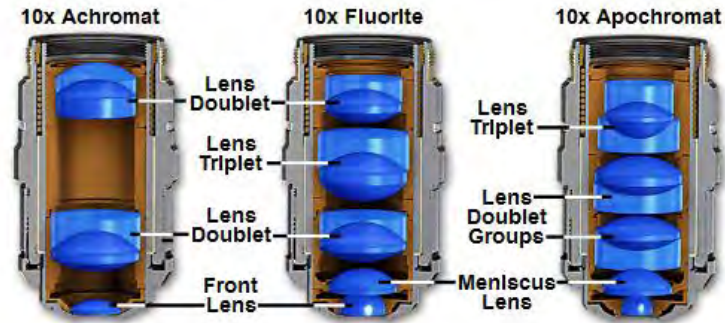


Fig. 2.12. Diagrama comparativo de objetivos 10x acromáticos, de fluorita y apocromáticos [20].

## 2.9 Fotodiodo

Es un dispositivo semiconductor que convierte la luz a corriente eléctrica. Esta corriente se genera cuando hay absorción de fotones dentro del fotodiodo. Según la construcción del fotodiodo, éstos pueden tener filtros ópticos, lentes especializadas y áreas activas de distintos tamaños. Por lo general, mientras mayor el área activa, menor es el tiempo de respuesta del dispositivo [21].

Son similares a los diodos semiconductores regulares, salvo que, dependiendo nuevamente de su construcción, los fotodiodos están expuestos o empaquetados con una ventana para así permitir la llegada de la luz a la zona sensible de éstos. La mayoría de los diodos diseñados para utilizarse como fotodiodos, son construidos en una unión PIN y no en una P-N para así incrementar la velocidad de respuesta. Están diseñados para operarse en inversa [21].

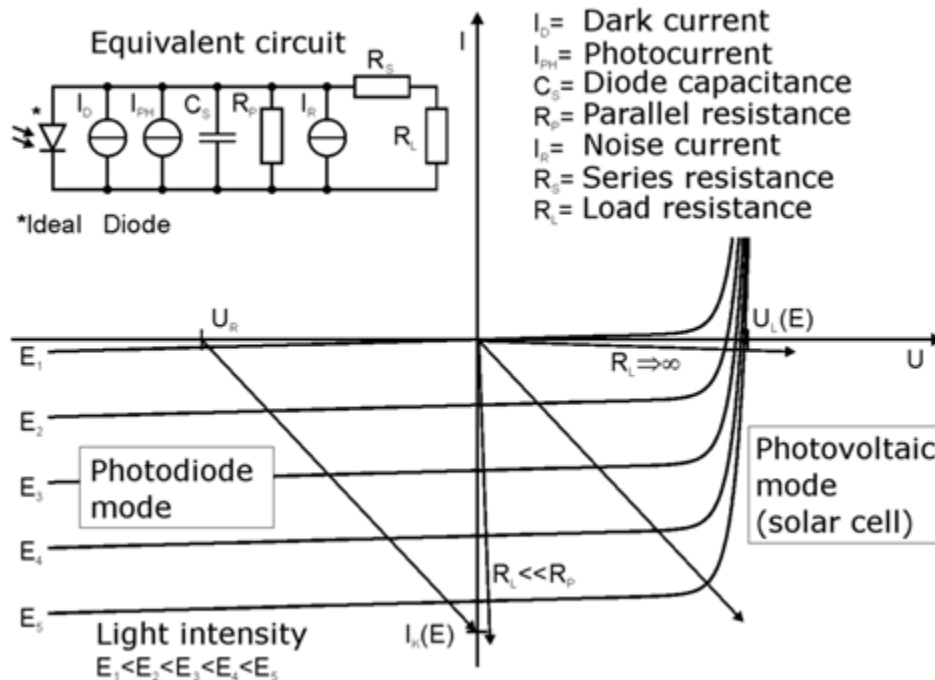


Fig. 2.13. Curva característica de un fotodiodo [22].

De la **Figura 2.13**, las líneas de carga lineales representan la respuesta del circuito externo:

$$I = \frac{\text{Voltaje de inversa aplicado o Voltaje del Diodo}}{\text{Resistencia Total}} \tag{2.4}$$

Los puntos de intersección con las curvas representan la corriente y voltaje para un punto de operación determinado, así como su resistencia y su iluminación.

Cuando un fotón llega a la superficie del diodo, éste crea un par electrón-hueco. Esto también se conoce como efecto fotoeléctrico interior. Si la absorción aumenta en la juntura de vaciado, los portadores son removidos de la juntura debido al campo eléctrico que se genera en la zona de vaciado. Los huecos se mueven hacia el ánodo y los electrones hacia el cátodo, produciendo una "fotocorriente". La corriente total que pasa a través de un fotodiodo es la suma de la corriente oscura (corriente que se genera en ausencia de luz) y la corriente generada en presencia de luz, por lo que la corriente oscura debe ser minimizada para así maximizar la sensibilidad del dispositivo [23].

El material utilizado para la construcción de un fotodiodo es crítico para definir sus propiedades, esto debido a que únicamente los fotones con suficiente energía podrán

excitar a los electrones a lo largo de la banda prohibida del material para producir fotocorrientes significativas.

Los materiales más utilizados son [24]:

Material	Longitudes de onda detectables [nm]
Silicio	190 - 1100
Germanio	400 - 1700
Arseniuro de Indio - Galio	800 - 2600
Sulfuro de Plomo (II)	< 1000 - 3500
Telururo de Cadmio - Mercurio	400 - 14000

### 2.10 Motor de Pasos

Son motores de corriente directa que operan utilizando el principio de atracción y repulsión magnética para convertir pulsos digitales en rotaciones mecánicas. La cantidad de rotación alcanzada es directamente proporcional al número de pulsos de entrada generados y la velocidad es proporcional a la frecuencia de los pulsos. Un motor de pasos básico tiene un imán permanente o un rotor de acero, junto con un estator. El torque requerido para rotar el motor de pasos es generado al conmutar la corriente en las bobinas del estator [25].

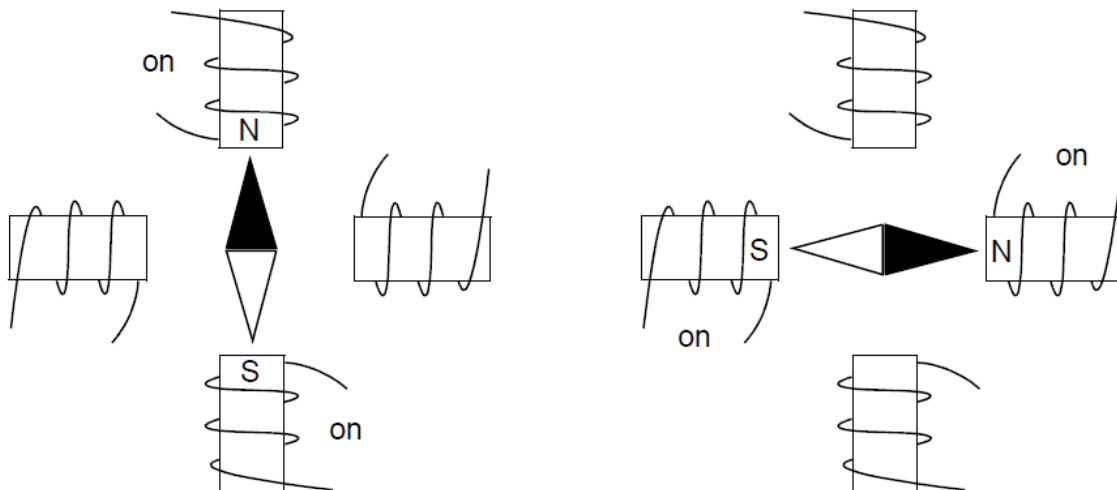


Fig. 2.14. Funcionamiento simplificado de un motor de pasos [25].

A pesar de que para ejemplificar su funcionamiento sólo se muestran cuatro polos del estator, en realidad existen diversas construcciones de motores en las que la cantidad de polos es variable. Si la corriente a través de una bobina es incrementada, mientras se disminuye en otra, la nueva posición del rotor se encontrará en un punto entre las dos bobinas y el tamaño del paso es una fracción definida de un paso completo (micropaso).

El tamaño del micropaso depende por completo de la resolución del driver electrónico.

Para describir la dirección de movimiento de un motor de pasos, se utiliza *positivo* y *negativo*. Un movimiento positivo significa que se pasa de una menor posición absoluta a una mayor; un movimiento negativo significa lo contrario.

Los parámetros más importantes de un motor de pasos son:

- Ángulo de paso: avance angular del motor para cada pulso.
- Número de pasos: pasos necesarios para dar una vuelta.

$$NP = \frac{360^\circ}{\text{Ángulo de paso}}$$

(2.5)

- Voltaje de paso.
- Corriente de paso.

### *Referencias del capítulo*

- [1] Maxwell, C. A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. **155** 459-512. (1865)
- [2] Atchison, D. Optics of the Human Eye. Butterworth-Heinemann. (2000)
- [3] McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology. 5ta Edición. McGraw-Hill. (1993)
- [4] Hecht, E. Optics. 2da Edición. Addison Wesley. (1987)
- [5] Greivenkamp, J. Field Guide to Geometrical Optics. SPIE Field Guides. **1** 19-20. (2004)
- [6] Schuster, A. An Introduction to the Theory of Optics. Edward Arnold. (1904)
- [7] Lekner, J. Theory of Reflection, of Electromagnetic and Particle Waves. Springer. (1987)
- [8] Françon, M. Optical Image Formation and Processing. Academic Press. (1979)
- [9] Chow, W. W. Semiconductor-Laser Fundamentals. Springer. Berlin. (1999)
- [10] Saleh, B. E. A. Fundamentals of Photonics. John Wiley & Sons, Inc. New York (1991)
- [11] Coldren, L. A. Diode Lasers and Photonic Integrated Circuits. John Wiley & Sons. New York. (1995)

- [12] Fukuda, M. Optical Semiconductor Devices. John Wiley & Sons. E.U.A. (1999)
- [13] Linti, G. The Group 13 Metals Aluminium, Gallium, Indium and Thallium. Chemical Patterns and Peculiarities. Angewandte Chemie International Edition **50** 11569. (2011)
- [14] Skierbiszewski, C. High power blue–violet InGaN laser diodes grown on bulk GaN substrates by plasma-assisted molecular beam epitaxy. Semiconductor Science and Technology. **20** 809-813. (2005)
- [15] Lopez, M. Atomistic simulation of InGaN/GaN quantum disk LEDs. Optical and Quantum Electronics. **44** 89-94. (2012)
- [16] Introduction to Laser Technology. Lasersaur. Melles Griot. (2015)
- [17] Schielke, T. Interchangeable lenses allow for differentiated light distribution in architectural lighting. LEDS Magazine. June. (2011)
- [18] Loudon, R. The quantum theory of light. Oxford University Press. Third Edition. E.U.A. (2000)
- [19] Keller, M. Light Fantastic: The Art and Design of Stage Lighting. Prestel. (1999)
- [20] Spring, K. Microscope Objectives. Olympus Microscopy Resource Center. (2008)
- [21] Brooker, G. Introduction to Sensors for Ranging and Imaging. Institution of Engineering and Technology. E.U.A. (2009)
- [22] Cox, J. Fundamentals of linear electronics: integrated and discrete. Cengage Learning. (2001)
- [23] Tavernier, F. High-Speed Optical Receivers with Integrated Photodiode in Nanoscale CMOS. Springer. (2011)
- [24] Held, G. Introduction to Diode Technology and Applications. CRC Press. (2008)
- [25] KST101. K-Cube Stepper Motor Controller. Kinesis User Guide. Thorlabs. (2017)

## Capítulo 3 Nanoscopía óptica

En la microscopía óptica convencional el límite de difracción es un problema para obtener imágenes u observar objetos del orden de nanómetros, pero en la actualidad se han desarrollado sistemas ópticos que permiten ir más allá del límite de difracción y obtener imágenes de resolución nanométrica. En este capítulo se hablará del desarrollo y principio de operación de estos sistemas ópticos, así como del origen de la Nanoscopía y de sus aplicaciones en la nanotecnología.

### *3.1 El origen de la Nanoscopía*

La definición exacta de resolución y sus consecuencias por lo general es confundida debido a su importancia. La resolución se define por la separación entre dos puntos. Para poder resolver un objeto, se necesita separarlo de todos los demás objetos cercanos a él; pero, como se mencionó en el capítulo anterior, en la microscopía donde se ve involucrada la luz, su resolución está limitada por la difracción. Cuando la luz es enfocada a través de algún método óptico para formar una imagen, la difracción limita el tamaño al que la luz puede ser realmente enfocada. Este no es un efecto significativo para objetos de un tamaño mayor al de la longitud de onda, pero para objetos de un tamaño menor a unas cuantas micras, el efecto de la difracción es notable e importante.

Siempre que la luz pasa a través de un objeto puntual, se genera un patrón de difracción con anillos concéntricos con un máximo y un mínimo de intensidad. Las aperturas numéricas mayores (NA) producen anillos de difracción más cercanos espacialmente entre sí. Cuando los objetos puntuales son muy cercanos y sus máximos y mínimos se traslapan, no se produce una diferencia en intensidad, por lo que los objetos no se pueden resolver y se observan como uno solo. Se requiere de una separación para que haya una variación en intensidad entre los dos objetos. Existen varias derivaciones y definiciones de exactamente cuánta es la separación mínima necesaria para notar esta diferencia de intensidad, pero comúnmente se consideran 200 nm como el valor mínimo. Sin embargo, a este valor es necesario agregarle otros factores como las aberraciones, las relaciones señal-ruido y el uso de longitudes de onda distintas.

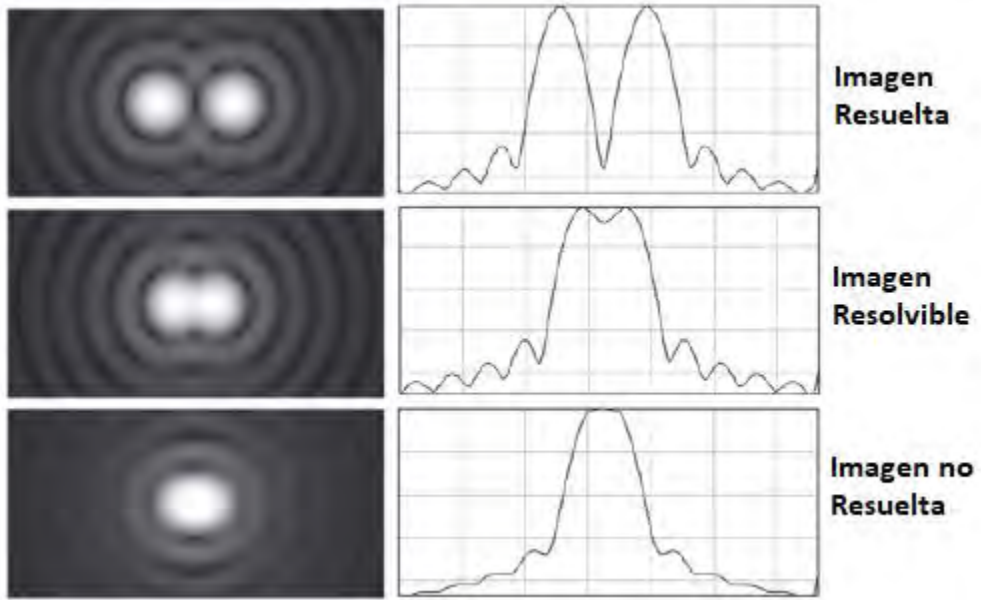


Fig. 3.1. Contraste producido por distintas separaciones de dos objetos puntuales.

La resolución es algo muy distinto a la habilidad de detectar un objeto de cierto tamaño. En la mayoría de los métodos de formación de imágenes por fluorescencia, los objetos menores a la escala de resolución aparecen como objetos del tamaño de la escala – una molécula fluorescente de 1 nm se verá de 200 nm de diámetro. Este será el caso para cualquier objeto por debajo de la escala sin importar su tamaño.

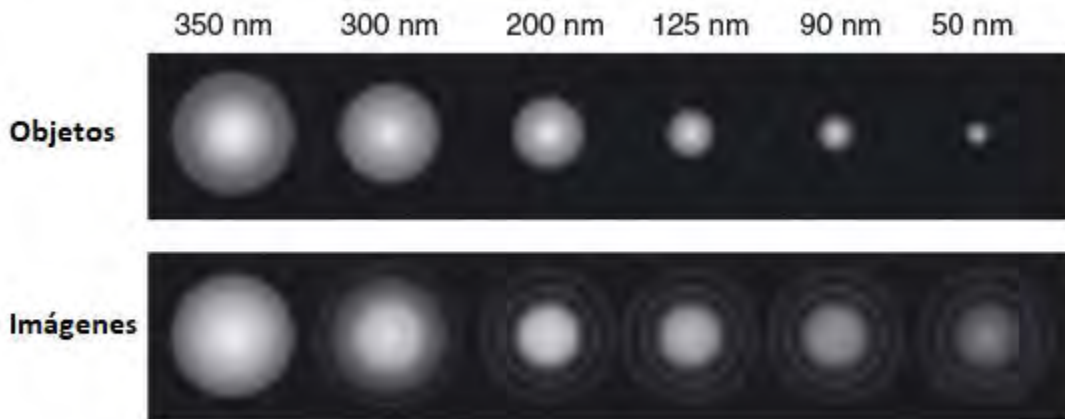


Fig. 3.2. Representación esquemática de la capacidad de resolver objetos menores a la escala de resolución [1].



Sin embargo, a raíz del otorgamiento del Premio Nobel de Química en 2014, la Nanoscopía comenzó una nueva etapa de desarrollo, a través de la cual se han desarrollado distintos métodos para la visualización de muestras. A continuación, se mencionarán algunos de estos métodos.

### 3.2 STED (Stimulated Emission Depletion)

Este tipo de microscopía mejora la resolución de la fluorescencia en un punto limitando la región espacial de excitación efectiva y logra hacer esto a través de un agotamiento en la emisión [2] [3]. La iluminación de ciertos fluoróforos excitados con longitudes de onda mayores puede generar emisiones no productivas. La presencia de iluminación intensa con longitud de onda igual a la de agotamiento genera esta emisión.

Coordinando espacialmente la iluminación de excitación y agotamiento, la región de excitación efectiva puede hacerse menor a la normalmente alcanzada en un método limitado por la difracción. Esta mejora normalmente se logra en un microscopio confocal de barrido de dos puntos, en donde ambos haces (el de excitación y el de agotamiento) se hacen coincidentes [4]. Una lente de fase en la trayectoria del haz de agotamiento puede producir un haz en forma de dona con interferencia destructiva, dando como resultado un punto de casi nula intensidad en el centro. Este haz en forma de dona puede ser alineado para encerrar la zona de excitación, donde la interacción entre las dos longitudes de onda y los patrones de iluminación producen una región de excitación menor a la que se produce a través de métodos ópticos convencionales.



Fig. 3.3. Arreglo experimental habitual de Microscopía STED [5].

La muestra es barrida con este haz en forma de dona y una imagen es producida, como en un microscopio confocal regular. Un detector puntual captura la intensidad de la emisión y ésta es correlacionada con la posición del haz para generar una imagen bidimensional. Debido a que la región de excitación es menor a la zona limitada por la difracción, la imagen generada es de una resolución menor al límite de difracción.

La resolución únicamente puede ser mejorada lateralmente con la potencia de agotamiento (en XY). La resolución,  $\Delta x$ , en la microscopía STED gana un término adicional a la fórmula de resolución de Abbe, en donde  $I$  es la intensidad de agotamiento e  $I_s$  es la intensidad que causa la saturación del agotamiento [6].

$$\Delta x \approx \frac{\lambda}{2NA \sqrt{1 + \frac{I}{I_s}}} \tag{3.1}$$

Fórmula de resolución de Abbe para microscopía STED [6].

No hay un límite teórico para el mejoramiento de la resolución, y resoluciones de hasta 2.4 nm han sido alcanzadas [7]. En la práctica, las potencias de agotamiento alcanzables y otros factores como las aberraciones en el haz de enfoque y lo robusto de la señal de los fluoróforos limitan la resolución entre 25 y 80 nm.

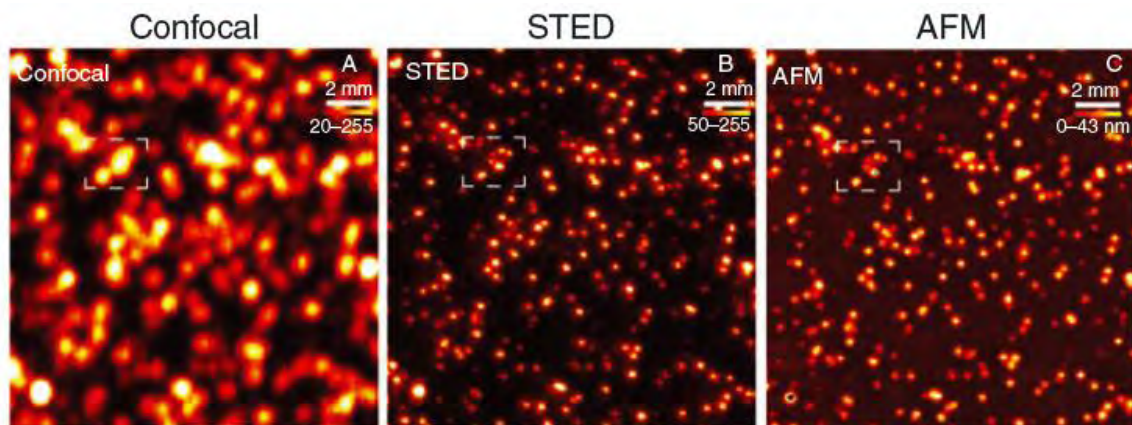


Fig. 3.4. Ejemplo de resolución de microscopía STED en comparación con microscopía confocal (limitada por difracción) y AFM (no limitada por la difracción) [8].

Un arreglo experimental distinto para la generación del haz STED puede producir mejoras en las imágenes relacionadas al eje Z [9]. Esta es una mejora significativa para la generación e interpretación de datos en 3D y ahora se encuentra disponible como un sistema comercial. La iluminación a través de dos objetivos opuestos provee un arreglo de agotamiento que genera una resolución isotrópica, por lo que es conocido como iso-STED.

Con esta técnica se han llegado a producir resoluciones axiales por debajo de los 50 nm [10] [11].

Métodos que utilizan láseres pulsados ofrecen medios adicionales para mejorar la resolución ya que permiten medir el tiempo de vida de la fluorescencia. Detectores con resolución temporal adecuada se sincronizan con la excitación pulsada, permitiendo el procesamiento del tiempo promedio en el que el fluoróforo se encuentra en estado excitado [12] [13]. Existen distintos fluoróforos adecuados para la microscopía STED, y su número continuamente se incrementa [14] [15], sin embargo, la dificultad de síntesis y los requerimientos de éstos, han sido un inconveniente que no ha permitido que la microscopía de fluorescencia sea completamente reemplazada por la microscopía STED. Otro factor importante es la alta intensidad de los láseres de agotamiento, ya que esta podría dañar partes de la muestra a examinar.

El microscopio confocal es una herramienta indispensable para la visualización de muestras gruesas, por lo que la naturaleza confocal de la microscopía STED debería ofrecer ventajas similares. Esto es correcto de cierta forma, ya que el *pinhole* actúa como un filtro espacial que elimina el ruido de fondo de tamaño mayor al deseado. Sin embargo, la limitación de la microscopía STED radica en la degradación de los patrones de agotamiento y de excitación – estos se distorsionan y se dispersan al entrar en contacto con una muestra gruesa, por lo que la resolución disminuye drásticamente. A pesar de esto, se ha logrado profundizar en este tipo de muestras en algunos cientos de micras [16] [17]. Avances recientes en técnicas ópticas han mejorado esto para muestras fijas [18] [19] [20].

En general, mientras más resolución se busca en una imagen de STED, más tardado es el proceso de adquisición de la imagen. Se requiere de más información para refinar aún más la imagen, por lo que, si la velocidad de adquisición de datos es la misma, el tiempo para producir la imagen es mayor. Se ha logrado alcanzar velocidades similares a las de adquisición de video, abatiendo casi por completo este problema [21]. Otra manera en la cual se ha buscado acabar con este inconveniente es con múltiples puntos de adquisición y cámaras para facilitar el análisis de muestras vivas [22].

### 3.3 SIM (*Structured Illumination Microscopy*)

La SIM involucra iluminación de la muestra con un patrón de luz y la explotación de una interacción entre la muestra y el patrón definido de excitación para mejorar la resolución. Un patrón de rejillas de iluminación se forma y es proyectado hacia la muestra. Franjas de Moiré se obtienen como resultado y son capturadas por cámaras basadas en rutinas. Los patrones tan finos de fluorescencia contrastan dentro de la muestra e interfieren con los patrones de excitación para producir nuevos patrones de menor frecuencia que pueden ser capturados a través de óptica común [23]. Distintos ángulos y traslaciones de la iluminación estructurada son grabados en la imagen de la muestra por completo [24]. Al procesar

distintas imágenes, las estructuras en la muestra pueden obtenerse con mayor resolución que las obtenidas en microscopía de fluorescencia convencional.

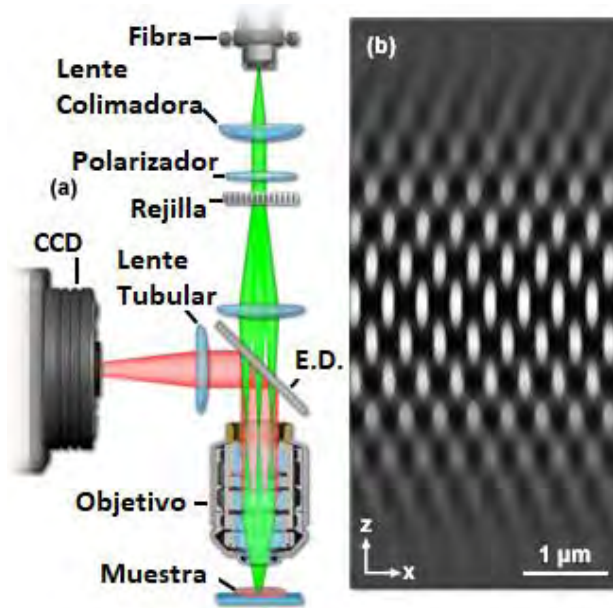


Fig. 3.5. Arreglo experimental habitual de SIM (a) y patrón de iluminación de SIM (b) [25].

La resolución en la SIM está limitada a máximo dos veces la estándar, aproximadamente a 100 nm. Las imágenes de muchas estructuras no cambian de manera significativa al pasar de 200 a 100 nm, debido a que pueden ser todavía más pequeñas o el espaciamiento entre estas estructuras es muy denso como para que el mejoramiento detecte alguna diferencia. Sin embargo, la mejora se hace de manera tridimensional, por lo que la resolución lateral se mejora máximo dos veces, teniendo como resultado una resolución volumétrica mejorada en  $2^3$  veces. Al visualizar pequeñas estructuras puntiagudas, esta mejora podría ser significativa para el estudio de nanomateriales que se encuentren muy por debajo del límite de difracción.

La gran mayoría de los fluoróforos que se ocupan en la microscopía de fluorescencia convencional, son compatibles con la SIM; sin embargo, ésta funciona mejor con muestras sumamente delgadas. Se ha trabajado con muestras de hasta 10  $\mu\text{m}$  de grosor, ya que, en estructuras de mayor tamaño, los patrones estructurales se dispersan y las mejoras en cuanto a resolución se ven disminuidas. La disminución de aberraciones esféricas es de vital importancia para la obtención de buenas imágenes con SIM, por lo que se ha optado por buscar métodos de detección en tiempo real que ayuden con esta disminución [27 - 30].

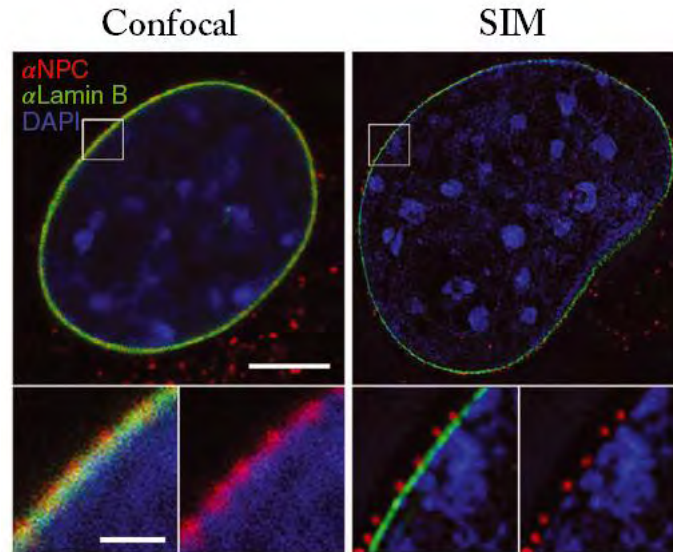


Fig. 3.6. Comparación de resultados entre Microscopía Confocal y SIM de macromoléculas biológicas a 130 nm [26].

### 3.4 Single-Molecule Positioning Methods (SMPM)

Una gran variedad de técnicas con diversos nombres existe basada en la idea de obtener una imagen iterativa del posicionamiento de una sola molécula [31] [32] [33]. Cuando una sola molécula puede ser observada de manera aislada, puede ser posicionada de una forma más precisa, de tal forma que puede ser resoluble a partir de cualquiera de las partículas vecinas. Este tipo de microscopía logra obtener un mapa de alta densidad de las posiciones de las moléculas aisladas. Si todas las moléculas fueron observadas simultáneamente, la resolución estaría limitada por la difracción, mientras que el visualizarlas secuencialmente permite obtener mejores resoluciones.

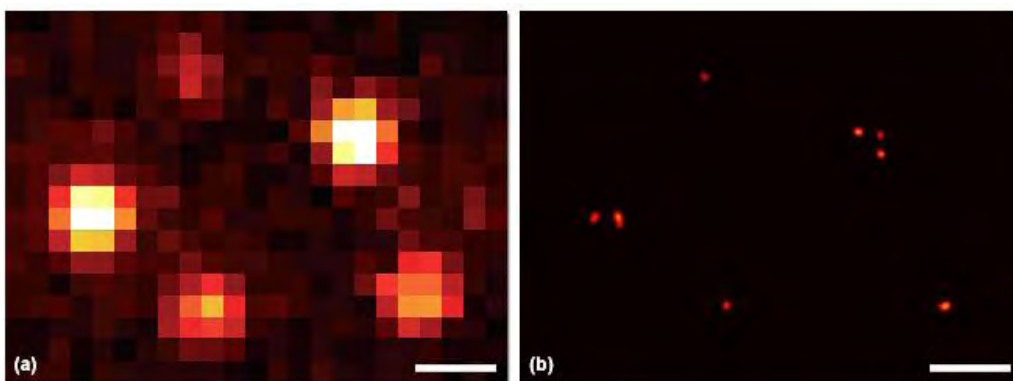


Fig. 3.7. Moléculas siendo observadas simultáneamente (a) y moléculas siendo observadas de manera aislada (b) [34].

Existen dos clases de reactivos para lograr este tipo de imágenes: proteínas fluorescentes que cambian su fotoactividad de alguna manera, y fluoróforos químicos que pueden hacer la transición entre estados "oscuros" y "brillantes". Proteínas fluorescentes fotoactivables (de estados oscuros a emisivos) y fotoconvertibles (cambios de color en fluorescencia, usualmente de verde a rojo) han sido desarrolladas y proveen un excelente medio para observar muestras biológicas [35] [36].

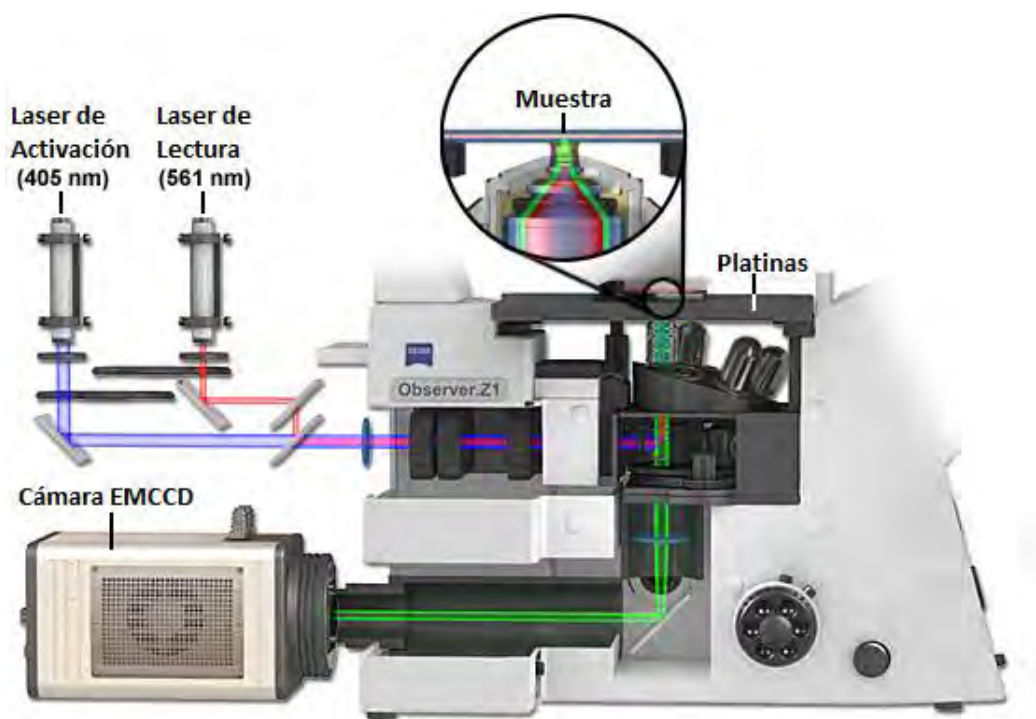


Fig. 3.8. Arreglo para Identificación de Moléculas Aisladas [34].

El punto clave es lograr las transiciones entre estados oscuros y brillantes. Pares de colorantes pueden ser inducidos para realizar estos cambios [37 - 40]. Sin importar la manera en la que se logren estas transiciones, la adquisición de la imagen involucra la captura de miles de cuadros de datos durante varios minutos, requiriendo también un tiempo de posprocesamiento para generar la imagen de salida con el correcto posicionamiento de las moléculas procesadas, así como de la corrección de aberraciones y distorsiones imputables a los sensores. Estos tiempos presentan grandes limitaciones con muestras cuyo tiempo de vida útil es muy corto.

La resolución alcanzable con estos métodos es significativamente mayor que aquella alcanzada con SIM y muy similar a la alcanzada con STED. Esta depende un factor fundamental: La precisión de las escalas de posicionamiento con relación a los fotones emitidos por parte de las moléculas. Teóricamente se pueden obtener precisiones nanométricas muy similares a las obtenidas a través de Microscopía Electrónica, pero con

un nivel de contraste mucho mayor. Sin embargo, en la práctica diversos factores como la estabilidad mecánica, aberraciones, las limitaciones de señales de salida y de precisión de posicionamiento, nos dan como resultado resoluciones no tan favorables. Las resoluciones típicamente alcanzables se encuentran alrededor de los 20 nm. A pesar de que esta resolución es 10 veces mejor a la resolución limitada por la difracción, las diferencias entre 1 y 20 nm son muy significativas si se desean analizar nanomateriales.

### ***3.5 Comparación entre técnicas***

Haciendo un análisis entre los métodos presentados a través de la literatura consultada, se puede concluir que, en cuanto a resolución, las mejoras con respecto a la microscopía habitual son considerables. La microscopía STED suele dar resoluciones de aproximadamente 15 nm en XY y alrededor de 500 nm en Z, ya que este eje no recibe ningún tipo de mejora. SIM mejora hasta en dos veces la resolución en cada eje, por lo que se tienen 100 nm en XY y aproximadamente 250 nm en Z. Las técnicas de fotoactivación, si son implementadas en 3D, generan resoluciones de entre 20 y 50 nm. Estos números se siguen optimizando, pero estos son los valores alcanzables por equipos comerciales en la actualidad.

Las velocidades de adquisición también varían considerablemente. Para muestras fijas, esto no representa ningún problema. Sin embargo, para muestras vivas, este puede ser un factor crítico. La microscopía STED, al estar basada en un principio confocal, es capaz de alcanzar altas velocidades de adquisición, así que es muy compatible con muestras vivas. La SIM, al estar basada en adquisiciones con cámaras de campo amplio, obtiene imágenes en cuestión de segundos para imágenes pequeñas debido a su procesamiento computacional. La microscopía de fotoactivación solía tomar entre horas y días en analizar una muestra, sin embargo, avances recientes han logrado obtener imágenes en cuestión de minutos.

Finalmente, las profundidades de la muestra a las que pueden llegar no son muy distintas entre ellas. La microscopía STED ofrece beneficios debido al *pinhole* que filtra espacialmente la luz de fondo, pero tiene un límite. La SIM se ve únicamente limitada por la sensibilidad de los detectores que procesan la imagen. El procesamiento con microscopía de fotoactivación es distinto a los otros métodos; debido a que se procesa una sola imagen en una posición Z determinada, se necesitan adquirir una serie de imágenes a distintas posiciones Z para ensamblar una imagen final. Este ensamble y las limitaciones son impuestas por el sistema computacional encargado de procesar los bancos de datos obtenidos.

	SIM	STED	Una sola Molécula
Principio	Patrón de Moiré que ilumina de manera estructurada	Reducción de la PSF a través de emisión estimulada	Fotoactivación
Resolución lateral	~ 100 nm	30 - 50 nm	10 - 40 nm
Resolución axial	< 300 nm	~ 30 - 600 nm	~ 10 - 50 nm
Elementos de contraste	Colorantes orgánicos	Colorantes orgánicos específicos	Proteínas, activadores y colorantes orgánicos
Preparaciones	Fijas, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Fijas, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Fijas e <i>in vitro</i>
Velocidad de adquisición	Media	Alta	Baja

Tabla 3.1. Comparación entre técnicas de Nanoscopia.

### 3.6 Ejemplos en Nanotecnología

En años recientes, desde que la Nanoscopia es una realidad, se han logrado distintos avances en la visualización de estructuras biológicas. Sin embargo, poco se ha hecho en relación con las nanoestructuras. A pesar de que todos los métodos desarrollados hasta ahora ofrecen una mejor resolución que aquellos limitados por la difracción, sus implementaciones producen resoluciones por debajo de las obtenidas a través de Microscopia de Electrones (EM). A través de EM se alcanzan resoluciones nanométricas, y para igualar esta clase de resolución, se requieren de métodos sumamente refinados; por lo que, la gran mayoría de los métodos desarrollados hasta ahora se ven limitados muy por arriba de esta resolución. Los avances más recientes en EM logran alcanzar resoluciones de hasta 50 picómetros, siendo las herramientas más vanguardistas en el análisis de nanomateriales [41]. A pesar de esto, la EM presenta una desventaja crucial: La preparación de muestras y la destrucción de estas. Las preparaciones son diversas, desde fijación química hasta congelamiento, pero esas mismas preparaciones no siempre garantizan que la muestra sea reutilizable para otra clase de análisis. Los métodos de visualización a través de EM son considerados altamente invasivos, por lo que las muestras orgánicas se ven sumamente dañadas, imposibilitando el análisis *in vivo* de las mismas.



Sin embargo, debido a que casi todos los métodos de Nanoscopia están basados en fluorescencia, éstos ofrecen una serie de herramientas únicas para el estudio de nanomateriales y de muestras orgánicas por igual. Las muestras pueden ser marcadas de una manera específica, y múltiples marcas permiten establecer una relación espacial entre múltiples muestras. Los nanomateriales pueden ser observados junto con sustancias u otros materiales que interactúan con ellos, dando lugar al estudio de la utilidad de ciertos nanomateriales en los procesos biológicos.

Algunas nanopartículas metálicas de distintos tipos y morfologías podrían usarse como catalizadores. El conocer cómo se catalizan las reacciones de interacción podría ser de gran ayuda para optimizar el proceso. Nanotubos de SiO<sub>2</sub> cubiertos de oro han sido visualizados con métodos de posicionamiento de una sola partícula para ubicar las reacciones individuales de fluorescencia. Agregando la suma individual de cada reacción, la variación espacial de rapidez catalítica a través del nanocatalizador, puede ser determinada [42]. Zhou et al. localizó el producto de una reacción con una precisión de 6 nm. Esto permite la visualización de rapidez de catalización a través de nanotubos de aproximadamente 21 nm de diámetro y de longitudes de entre 150 y 700 nm recubiertos por una capa de aproximadamente 80 nm de sílice mesoporoso. La reacción catalizada fue la oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de *Amplex Red*, obteniéndose un producto fluorescente que se adhiere al nanotubo por aproximadamente 100 milisegundos, el cual no se difunde, por lo que permite un posicionamiento preciso.

La asociación de proteínas con nanoestructuras metálicas – como nanohilos de plata y arreglos de nanotriángulos de oro – ha sido visualizada utilizando proteínas fluorescentes a través de PALM [43]. La *Dronpa* es una proteína fluorescente que ofrece transiciones fluorescentes reversibles, lo que permite visualizar y posicionar moléculas individuales. La proteína puede ser ligada a la superficie metálica a través de un anticuerpo. La precisión de posicionamiento logra ubicar nanotriángulos de entre 180 y 200 nm de longitud.

### *Referencias del capítulo*

- [1] A. Johnson. Nanoscopy for nanoscience: how super resolution microscopy extends imaging for nanotechnology. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* **7** 266-281. (2015)
- [2] B. Huang. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell.* **143** 1047-1058. (2010)
- [3] SW. Hell. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **19** 780-782. (1994)
- [4] SW. Hell. Toward fluorescence nanoscopy. *Nat. Biotechnol.* **21** 1347-1355. (2003)

- [5] S. Price. The Stimulated Emission Depletion (STED) Concept. Zeiss Microscopy Online Campus.  
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/superresolution/stedconcept/indexflash.html>
- [6] B. Harke. Resolution scaling in STED microscopy. *Opt. Express*. **16** 4154-4162. (2008)
- [7] D. Wildanger. Solid immersion facilitates fluorescence microscopy with nanometer resolution and sub-angstrom emitter localization. *Adv. Matter*. **24** OP309-OP313. (2016)
- [8] JV. Chacko. Sub-diffraction nano manipulation using STED AFM. *PLoS One*. **8** e66608. (2013)
- [9] B. Harke. Three-dimensional nanoscopy of colloidal crystals. *Nano Lett*. **8** 1309-1313. (2008)
- [10] SW. Hell. Diffraction-unlimited three-dimensional optical nanoscopy with opposing lenses. *Nat. Photon*. **3** 381-387. (2009)
- [11] R. Schmidt. Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells. *Nat. Methods*. **5** 539-544. (2009)
- [12] G. Vicidomini. Gated CW-STED microscopy: a versatile tool for biological nanometer scale investigation. *Methods*. **66** 124-130. (2014)
- [13] G. Vicidomini. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating. *Nat. Methods*. **8** 571-573. (2011)
- [14] K. Kolmakov. Red-emitting rhodamine dyes for fluorescence microscopy and nanoscopy. *Chemistry*. **16** 158-166. (2010)
- [15] K. Kolmakov. Polar red-emitting rhodamine dyes with reactive groups: synthesis, photophysical properties, and two-color STED nanoscopy applications. *Chemistry*. **20** 146-157. (2014)
- [16] S. Berning. Nanoscopy in a living mouse brain. *Science*. **335** 551. (2012)
- [17] NT Urban. STED nanoscopy of actin dynamics in synapses deep inside living brain slices. *Biophys. J*. **101** 1277-1284. (2011)
- [18] H. Hama. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci*. **14** 1481-1488. (2011)
- [19] MT Ke. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat. Neurosci*. **16** 1154-1161. (2013)
- [20] K. Chung. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*. **497** 332-337. (2013)
- [21] V. Westphal. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science*. **320** 246-249. (2008)

- [22] A. Chmyrov. Nanoscopy with more than 100,000 ‘doughnuts’. *Nat. Methods.* **10** 737-740. (2013)
- [23] MG Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* **198** 82-87. (2000)
- [24] MG Gustafsson. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys. J.* **94** 4957-4970. (2008)
- [25] MG Gustafsson. Superresolution Structured Illumination Microscopy. Zeiss Microscopy Online Campus.  
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/supersim.html>
- [26] L. Schermelleh. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science.* **320** 1332-1336 (2008)
- [27] P. Kner. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nat. Methods.* **6** 339-342. (2009)
- [28] L. Shao. Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination. *Nat. Methods.* **8** 1044-1046. (2011)
- [29] AG York. Instant super-resolution imaging in live cells and embryos via analog image processing. *Nat. Methods.* **10** 1122-1126 (2013)
- [30] AG York. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy. *Nat. Methods.* **9** 749-754. (2012)
- [31] E. Betzig. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science.* **313** 1642-1645. (2006)
- [32] MJ Rust. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods.* **3** 793-795. (2006)
- [33] ST Hess. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* **91** 4258-4272. (2006)
- [34] E. Betzig. Introduction to Photoactivated Localization Microscopy. Zeiss Microscopy Online Campus.  
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/introduction.html>
- [35] M. Fernández-Suárez. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9** 929-943. (2008)
- [36] J. Lippincott-Schwartz. Photoactivable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging. *Trends Cell Biol.* **19** 555-565. (2009)
- [37] J. Vogelsang. Make them blink: probes for super-resolution microscopy. *Chemphyschem.* **11** 2475-2490. (2010)

- [38] GT Dempsey. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods.* **8** 1027-1036. (2011)
- [39] SH Shim. Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109** 13978-13983. (2012)
- [40] DT Burnette. Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108** 21081-21086. (2011)
- [41] E. Rolf. Atomic-Resolution Imaging with a Sub-50-pm Electron Probe. *Physical Review Letters.* **102** 9. (2009)
- [42] X. Zhou. Quantitative super-resolution imaging uncovers reactivity patterns on single nanocatalysts. *Nat. Nanotechnol.* **7** 237-241. (2012)
- [43] H. Lin. Mapping of a surface-enhanced fluorescence on metal nanoparticles using super-resolution photoactivation localization microscopy. *Chemphyschem.* **13** 973-981. (2012)

## Capítulo 4 Instrumentación

A partir de este capítulo, se comenzará a presentar el desarrollo experimental llevado a cabo durante la implementación de este dispositivo, tomando como base el dispositivo desarrollado en [1]. Como primer punto, se explicará de manera detallada el funcionamiento de todos los componentes que forman parte del Nanoscopio, así como las pruebas y/o análisis practicados para cada uno.

A grandes rasgos, el diagrama general del dispositivo desarrollado es el siguiente:

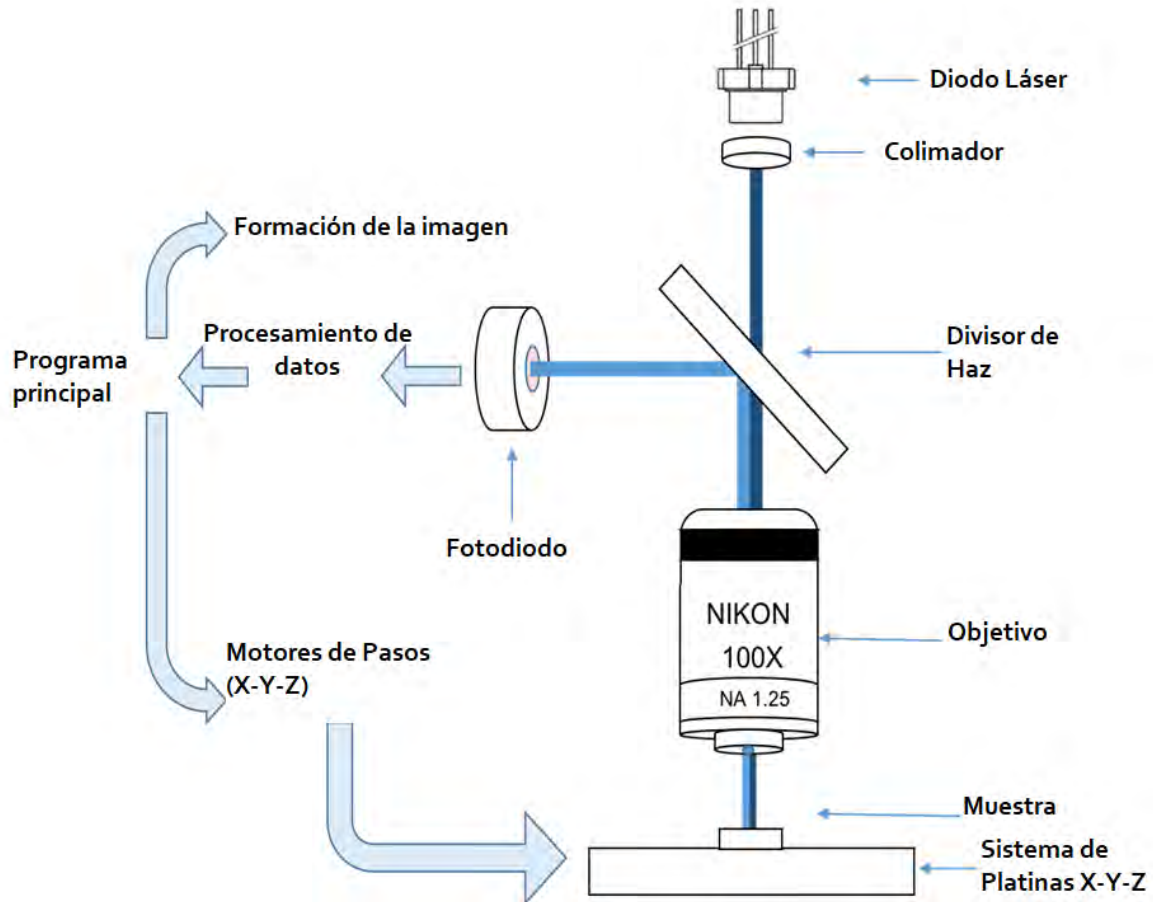


Fig. 4.1. Diagrama de los componentes del dispositivo.

### 4.1 Sistema Óptico

#### 4.1.1 Fuente de luz y accesorios ópticos

La fuente de luz es uno de los elementos más importantes del Nanoscopio. Ésta es la encargada de iluminar la muestra para su análisis. Se utiliza un Diodo Láser modelo DL-5146-101S de las siguientes especificaciones:

- $\lambda = 405 \text{ nm}$
- $P_o = 40 \text{ mW}$
- $I_{op} = 70 \text{ mA}$



Fig. 4.2. Diodo láser DL-5146-101S [2].

El diodo láser viene en un empaquetado TO-18, lo que permite que se pueda colocar en una montura con conexión directa a la fuente de alimentación. Debido a que el diodo no tiene una alta coherencia espacial, a la salida se ha montado una lente esférica que permite la colimación del haz.



Fig. 4.3. Montura con conexión y lente esférica [3].

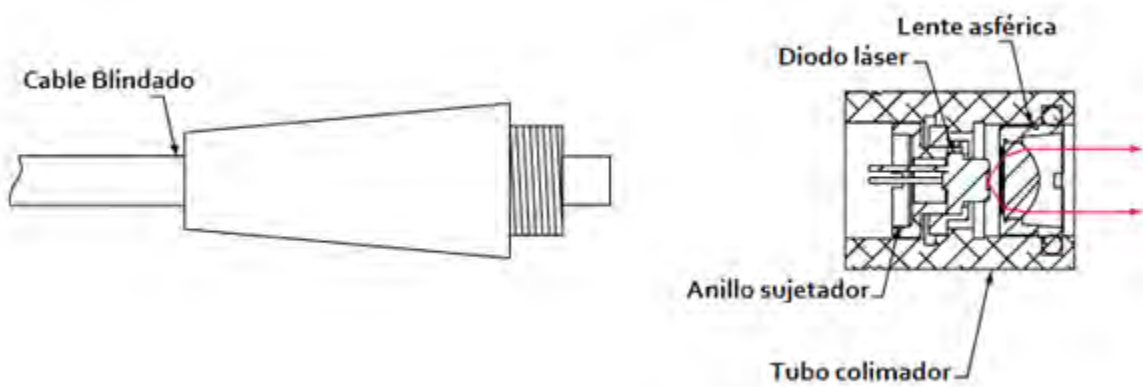


Fig. 4.4. Esquemático de la unión entre la montura, el diodo y el tubo colimador [3].

Se decidió utilizar este diodo láser debido al bajo límite de difracción que presenta en conjunto con el objetivo de microscopio del dispositivo, ver **Ecu. (4.1)**.

Siguiendo la trayectoria de la luz, ésta se encuentra con un divisor de haz. El divisor de haz envía la mitad de la potencia óptica hacia el objetivo, ésta se encargará de iluminar la muestra; la otra mitad se envía a un camino en el cual se pierde. La función principal del divisor de haz es enviar la luz reflejada por parte de la muestra hacia el fotodiodo.



**Fig. 4.5.** Divisor de haz.

#### 4.1.2 Objetivo

Como en un microscopio convencional, se utiliza un objetivo para coleccionar la luz y proporcionar una imagen aumentada de la muestra. El Nanoscopio utiliza un objetivo de 100X con las siguientes características:

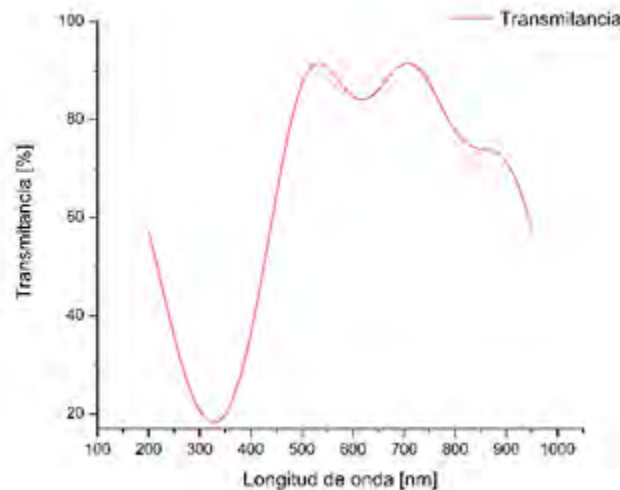
- Tipo: Acromático
- Aumento: 100X
- Apertura numérica: 1.25
- Medio de inmersión: Aire/Aceite
- Distancia de trabajo: 0.14 mm
- Marca: *Nikon*



**Fig. 4.6.** Objetivo *Nikon* 100X.

Debido a que el fabricante no proporciona una curva de transmitancia para este objetivo, se realizó una medición de dicha propiedad utilizando un Espectrofotómetro *Cary Series 5000 UV-VIS-NIR*.

Como puede apreciarse en la **Figura 4.7**, la transmitancia de este objetivo va desde los 350 hasta los 950 nm, teniendo aproximadamente una transmitancia del 35% para la luz de 405 nm. Se consideró que había transmitancia cuando se tenía un valor por encima del 20%.



**Fig. 4.7.** Curva de transmitancia del objetivo.

A través de los datos básicos del objetivo, se puede conocer la máxima resolución alcanzable – debido al límite de difracción – en conjunto con el diodo láser de 405 nm:

$$R = \frac{1.22\lambda}{2n \sin \theta} = \frac{0.61\lambda}{NA} = \frac{(0.61)(405 \text{ nm})}{1.25} = 197.64 \text{ nm}$$

(4.1)

#### 4.1.3 Fotodiodo

La reconstrucción de la imagen se hace a través de la luz reflejada por la muestra. La recolección de este reflejo se hace mediante un fotodiodo OPT301 de *Texas Instruments*, ver **Figura 4.8**.



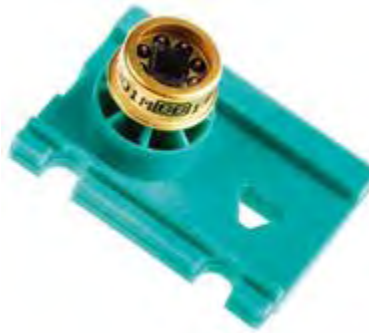


Fig. 4.8. Fotodiodo OPT301 [4].

Las características del OPT301 son:

- Rango de operación de 200 – 1100 nm.
- Responsividad en 650 nm de 0.47 A/W. La variación en responsividad con respecto a la longitud de onda se muestra en la **Figura 9**.
- Área activa (teórica) de 2.29 x 2.29 mm.
- Empaquetado TO-99 con un amplificador transimpedancia integrado.
- Resistencia de retroalimentación de 1 MΩ.

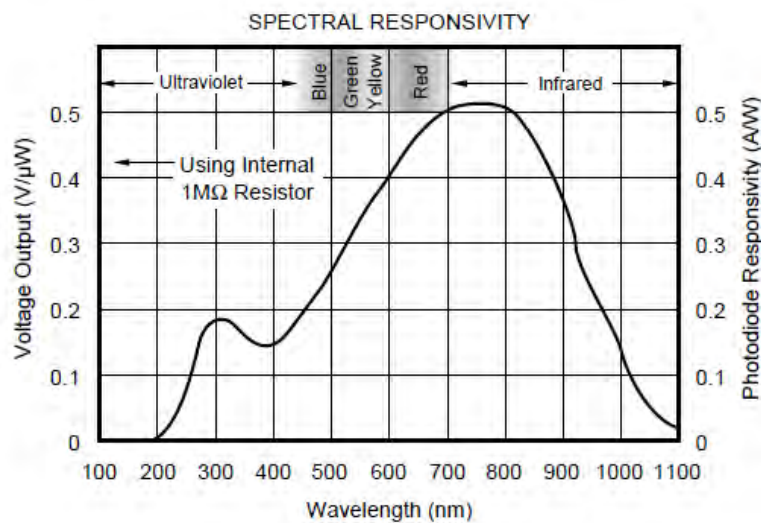
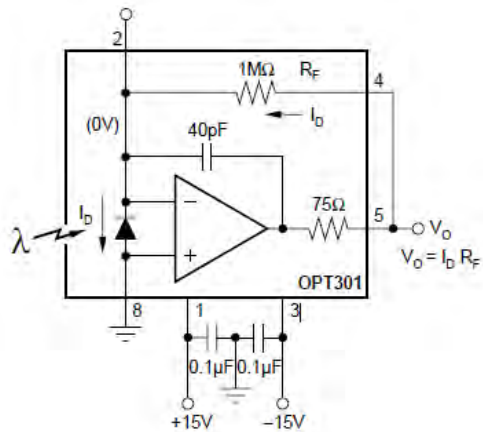


Fig. 4.9. Respuesta espectral del OPT301.

El OPT301 es un circuito integrado optoelectrónico que contiene un fotodiodo y un amplificador transimpedancia dentro de un empaquetado TO-99 hermético con una ventana de cristal. El amplificador transimpedancia consiste en un amplificador operacional de entrada FET y una resistencia *on-chip* hecha de una película metálica. El fotodiodo opera con cero corriente para garantizar una excelente linealidad y baja corriente de oscuridad. La combinación de estos dos elementos en un mismo

empaquetado elimina los problemas comúnmente encontrados al discretizar la señal, como errores de corriente, ruido y capacitancias parásitas.

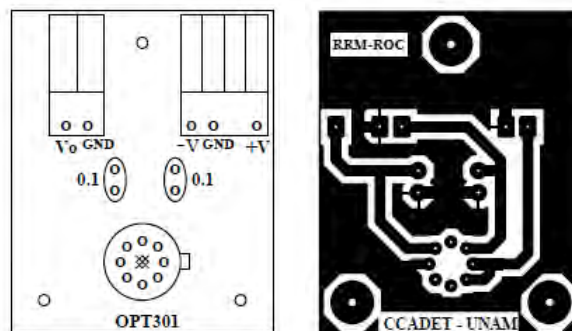
La **Figura 4.10** muestra las conexiones básicas necesarias para operar el OPT301. Con esta conexión, la salida siempre será cero cuando no hay iluminación y se incrementa con la presencia de ésta.



**Fig. 4.10.** Conexión básica de operación.

La corriente  $I_D$  del fotodiodo es proporcional a la potencia radiante (en Watts) que recibe el fotodiodo. El voltaje de salida es producto de la corriente del fotodiodo y la resistencia de retroalimentación ( $I_D R_F$ ).

Se diseñó una tarjeta para conectar el OPT301 basada en las conexiones recomendadas para su operación, ver **Figuras 4.11 y 4.12**.



**Fig. 4.11.** Diseño de la tarjeta de operación del OPT301.



Fig. 4.12. Tarjeta finalizada.

Asimismo, se manufacturó una caja de aluminio para protección e incorporación de la tarjeta y el fotodiodo al Nanoscopio, ver **Figura 13**.



Fig. 4.13. Caja de aluminio para protección.

Debido a la alimentación que el fotodiodo requiere para su correcto funcionamiento, se diseñó una fuente de alimentación de  $\pm 15$  V.

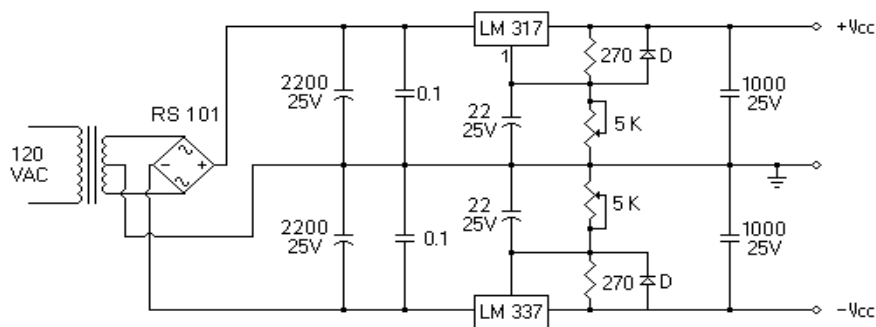


Fig. 4.14. Diagrama del circuito para la fuente de alimentación del fotodiodo.



Fig. 4.15. Fuente ensamblada.

Como último procedimiento se midió el tamaño real de la zona activa, así como la parte más sensible de esta. Esta medición se realizó incidiendo el haz del diodo láser de manera directa sobre la zona activa. El haz se colocó en uno de los extremos de la zona activa y con mediciones cada 50 micras, se elaboró una matriz de respuesta, ver **Figura 4.16**.

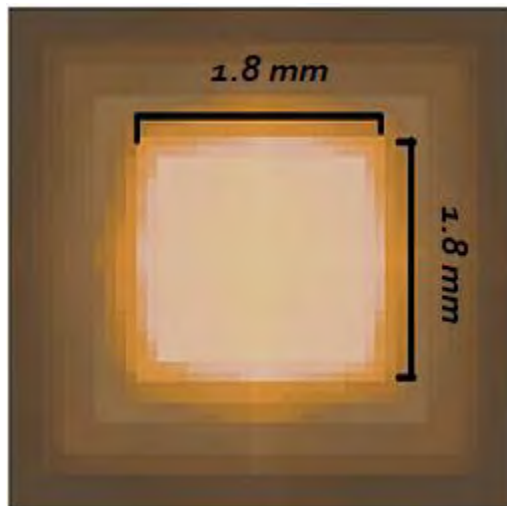


Fig. 4.16. Matriz de respuesta del OPT301.

Tras estas mediciones, se encontró que la zona activa real del fotodiodo es de aproximadamente  $1.8 \text{ mm}^2$ , siendo el centro la zona más sensible. El conocer esto es de suma importancia para así colocar el haz reflejado por la muestra en la zona capaz de generar una mejor resolución.

## 4.2 Sistema Mecánico

### 4.2.1 Platinas

Son la base del sistema de desplazamiento. Se cuenta con dos sistemas de platinas en este Nanoscopio.

El primer sistema tiene como función mover la muestra para que el haz de luz examine una zona determinada en dos ejes (XY), así como para garantizar el enfoque más adecuado del haz sobre la muestra en un eje (Z). Este sistema es manipulado por dos motores de pasos convencionales NEMA17 y un motor de pasos ZFS13B de *Thorlabs*. El segundo sistema tiene como función ajustar la distancia focal del objetivo sobre la muestra en dirección del eje Z, moviendo de manera uniforme la fuente luminosa, el divisor de haz y el objetivo. Este sistema es manipulado por un micrómetro diferencial con resolución de 5 micras.

El sistema de platinas con movimiento en XYZ es un *RollerBlock* RB13M de *Thorlabs*. El RB13M provee una solución compacta para movimientos en varios ejes, en comparación a apilar platinas con movimiento sobre un solo eje; además, debido a su construcción encapsulada, se garantiza un mayor tiempo de vida. Este sistema tiene 13 mm de viaje en tres direcciones ortogonales.

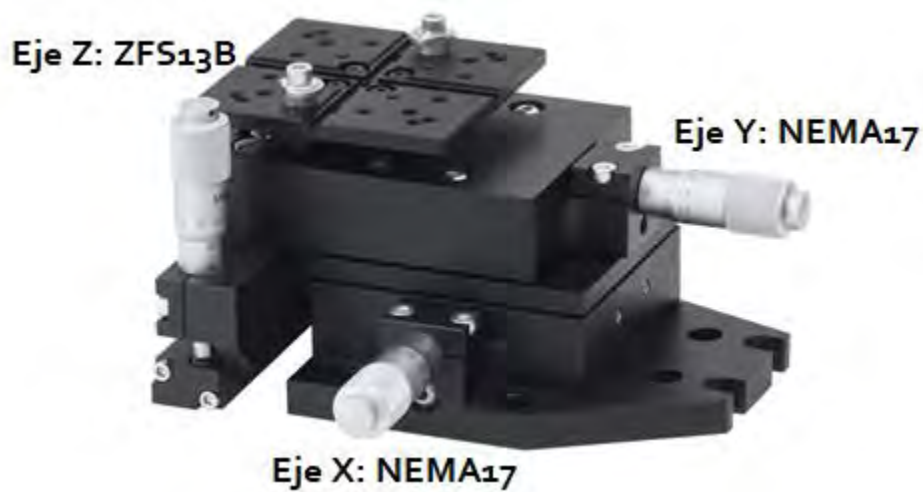


Fig. 4.17. Sistema de platinas RB13M [5].

Debido a que este sistema no incluye ningún micrómetro para su manipulación, la resolución mínima y máxima está dada por el dispositivo que se acople a cada eje.

## 4.2.2 Motores de pasos

Al contar con un sistema de platinas con movimiento en tres ejes, se requieren tres motores, uno por cada eje, para contar con un desplazamiento uniforme y garantizar una correcta exploración de los tres ejes.

Para los ejes X y Y se utilizan dos motores NEMA17. Se trata de motores de pasos de cuatro fases, unipolares y de imán permanente.

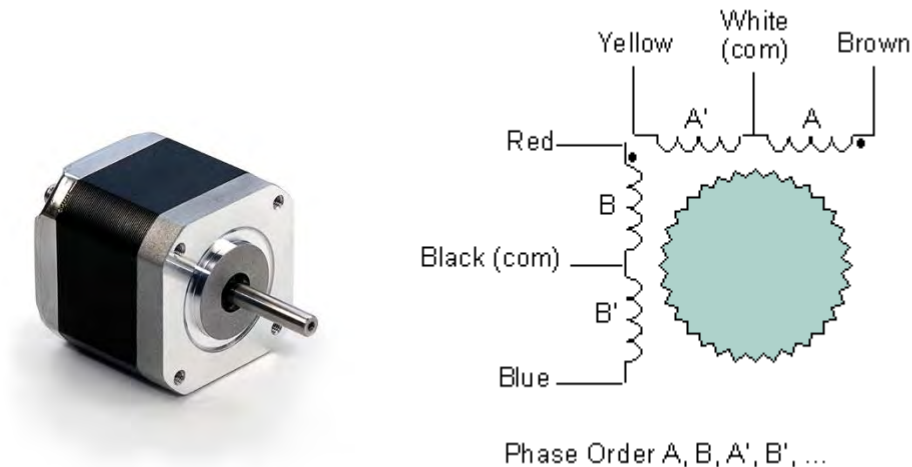


Fig. 4.18. Motor NEMA17 y su diagrama de conexión [6].

Estos motores son de tamaño estándar (1.7 pulgadas cuadradas, con poste de 5mm de diámetro). Manejan 200 pasos por revolución con una entrada de voltaje de 12V a 400 mA. Debido a la gran cantidad de pasos por revolución que maneja, son considerados como motores de alta resolución micrométrica, girando el poste únicamente  $1.8^\circ$  por cada paso completo.

Las especificaciones generales de estos motores son:

- $V_{op} = 12V$
- $I_{op} = 400 \text{ mA}$  (distribuidos en todas sus fases)
- Resistancia por fase:  $30 \Omega$
- Inductancia por fase: 23 mH
- Torque máximo: 220 g/cm

Como se muestra en el diagrama de la Figura 4.18, cuentan con seis cables. Los cables negro y blanco son los *taps* centrales del motor, por lo cual se conectan ya sea de manera interna o externa a la fuente positiva. Este diagrama también ilustra cómo es que se deben energizar los polos de cada fase: A, B, A' y B'. Energizándolo en este orden se obtiene una

rotación positiva (en sentido de las manecillas del reloj), mientras que, al energizarlos en orden inverso, se obtiene una rotación negativa (en contra de las manecillas del reloj).

Para el eje Z se utiliza un motor ZFS13B de *Thorlabs*. Este motor está diseñado para aplicaciones de alta precisión. Cuenta con un diseño compacto, de tamaño similar al de una memoria *flash usb* común. El motor cuenta con un tope físico que corta el suministro de energía si es que se llega a su límite mecánico, lo que garantiza que no se dañará en operaciones con traslados largos.



**Fig. 4.19.** Motor ZFS13B [7].

Es un motor de dos fases, bipolar, que opera a velocidades de hasta 3.0 mm/s. Debido a que la punta del motor es estática – es decir, no rota – la fricción y el desgaste se ven reducidos, mejorando la suavidad del movimiento y alargando el tiempo de vida tanto del motor como de la platina.

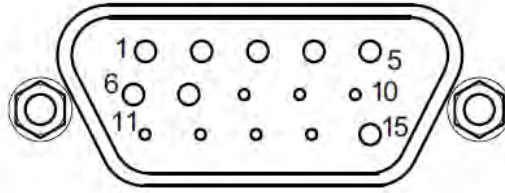
Cuenta con una cuerda de  $\varnothing 3/8''$  que permite su conexión inmediata a sistemas de platinas u otros motores con entradas compatibles.

A pesar de tener un diseño compacto, provee suficiente torque para cargas de hasta 40N.

Cuenta con las siguientes características:

- Viaje: 13 mm
- Retroceso < 15 micras
- Repetibilidad bidireccional: <5 micras
- Carga máxima: 40 N
- Velocidad máxima: 3.0 mm/s
- Aceleración máxima: 10 mm/s<sup>2</sup>
- Micropasos por revolución: 24 pasos completos; 2048 micropasos por paso completo; 49,152 micropasos por revolución.
- Temperatura de operación: 5 a 40°C
- Dimensiones: 35.00 x 19.00 mm

Este motor se conecta a través de un cable DB15, con las siguientes salidas:



Pin	Descripción	Pin	Descripción
1	Tierra Común	9	NC
2	Límite CCW	10	Vcc (+5VDC)
3	Límite CW	11	NC
4	Fase del Motor B -	12	NC
5	Fase del Motor B +	13	NC
6	Fase del Motor A -	14	NC
7	Fase del Motor A +	15	GND
8	SC		

Fig. 4.20. Diagrama de pines de un motor ZFS13B.

*Tierra Común* es una tierra común tanto a los límites de directa como de inversa.

*Límite CCW* es el límite antihorario (reverso) que previene que el motor exceda su extensión mínima.

*Límite CW* es el límite horario (frontal) que previene que el motor exceda su extensión máxima.

El motor requiere de un controlador para su operación. Dicho controlador es el que determina el tamaño de cada micropaso del motor. En la siguiente parte del presente capítulo se cubrirá este punto.

### 4.3 Sistema Electrónico

#### 4.3.1 Controlador para el motor ZF13B

Se utiliza un controlador KST101 de *Thorlabs*. Es un controlador compacto de un solo canal para la sencilla operación, manual o automatizada de motores de pasos bipolares de dos fases. Es capaz de controlar motores de hasta 15 V a 12 W con o sin retroalimentación de un codificador (o *encoder*). Incluye un DSP sencillo que provee una gran cantidad de micropasos para el motor controlado.





Fig. 4.21. Controlador KST101 [8].

Los motores de la serie ZFS dan 24 pasos completos por revolución, y al ser manipulados a través de un KST101, se requieren de 2048 micropasos para dar un paso completo, dando como resultado 49,152 micropasos por revolución del motor. Debido al acomodo interno de los motores, se requiere de 44.445 rotaciones para desplazar 1.0 mm al motor.

$$\text{Micropasos por revolución} \times \text{Rotaciones por milímetro} = \text{Pasos para 1 mm} \quad (4.2)$$

$$49,152 \times 44.445 = 2184560.64 \text{ pasos} \quad (4.3)$$

Finalmente:

$$1.0 \text{ mm} / 2184560.64 \text{ pasos} = 0.46 \times 10^{-6} = 0.46 \text{ nm por paso} \quad (4.4)$$

Por lo tanto, a través de la combinación entre los controladores KST101 y el motor ZFS13B, se tiene un paso mínimo de **0.46 nm**.

Para su operación manual, se debe manipular el movimiento del motor a través del panel de control frontal del controlador.



Fig. 4.22. Panel frontal del controlador KST101.

Las operaciones disponibles en modo manual son:

- Movimiento continuo.
- Establecimiento de velocidad y aceleración.
- Definición del tamaño de un paso.
- Movimiento por pasos.
- Selección de motor a controlar.

Para su operación de modo automatizado, se requiere del software *Kinesis*, del cual se hablará en el siguiente capítulo.

#### 4.3.2 Controlador del Diodo Láser

Se utiliza un controlador LDC201CU de *Thorlabs*. Este controlador es una fuente de alta precisión de inyección de corriente diseñada especialmente para diodos láser y LEDs. Es fácil de operar ya que todas sus funciones se encuentran en el panel principal. Cuenta con un display LED de 5 dígitos, botones de selección y perilla de ajuste extrafino.

El diodo láser se conecta a través de un cable DB9. La salida del diodo y la entrada de su fotodiodo de retroalimentación son bipolares, por lo que cualquier tipo de diodo láser puede ser conectado, sin importar su arreglo de polarización.

La inyección de corriente o la potencia óptica de salida del diodo láser pueden ser moduladas al aplicar una señal de modulación a la entrada.



**Fig. 4.23.** Fuente controladora LDC201CU [9].

La fuente está diseñada con las siguientes protecciones:

- Arranque lento; se le inyecta corriente al diodo de manera escalonada para evitar sobrecargas.
- Protección ante un circuito abierto; si la conexión con el diodo láser se interrumpe durante la operación, automáticamente se suspende la inyección de corriente.

Se cuentan con dos modos de operación, corriente constante (CC) y potencia constante (CP).

En el modo de corriente constante, el usuario debe manipular el potenciómetro de ajuste para fijar la corriente que le será suministrada al diodo láser durante toda la operación de la fuente. En este modo de operación la potencia óptica de salida es un parámetro no modificable. La fuente puede proveer desde 0 mA hasta 100 mA de corriente directa.

En el modo de potencia constante, el usuario debe manipular el potenciómetro de ajuste para fijar la potencia óptica de salida del diodo láser, aumentando o disminuyendo la corriente suministrada para siempre garantizar dicha potencia. En este modo de operación la corriente suministrada no puede ser modificada por el usuario. La fuente puede garantizar salida de potencia óptica desde 0.034 mW hasta 9.99 mW. En caso de que el diodo láser tenga una potencia óptica mayor a esta, el monitor de potencia óptica se deshabilitará de manera automática.

### 4.3.3 Tarjeta de adquisición de datos

La tarjeta de adquisición de datos es la encargada de leer la entrada de voltaje del fotodiodo para después enviar dicha lectura a la computadora, así como de proveer a los motores NEMA17 de las señales seno y coseno moduladas para su desplazamiento.

Debido a que tanto la lectura debe ser lo más precisa posible, se utiliza una NI USB 6343 de *National Instruments*, ya que ésta cuenta con una resolución de entrada de 16 bits.



**Fig. 4.24.** Tarjeta de adquisición NI USB 6343 [10].

Las características generales de la tarjeta de adquisición son las siguientes:

- Bus: USB
- Entradas analógicas: 32
- Resolución de entrada: 16 bits
- Salidas analógicas: 4
- Velocidad máxima de operación: 1 MHz
- Salida máxima de voltaje:  $\pm 10$  V

Las cuatro salidas analógicas son utilizadas para controlar el movimiento de los motores (2 por cada eje). Una entrada analógica se utiliza para la lectura del fotodiodo.

En términos generales, la tarjeta no es aprovechada por completo con el funcionamiento actual del nanoscopio, ya que aún se tienen 31 entradas analógicas disponibles. Sin embargo, debido al potencial de escalabilidad que este tiene, el resto de las entradas con las que cuenta pueden utilizarse a futuro para otro tipo de sensores.

### *Referencias del capítulo*

[1] E. Aguilar-Mendoza. Integración de la señal óptica para obtener imágenes de nanotecnología. Tesis de Licenciatura. UNAM. 2017.

[2] DL-5146-101S. SANYO Electric Co., Ltd. Hoja de datos. (2009)

[3] LT110P-B - Collimation Tube with Optic for  $\varnothing 5.6$  and  $\varnothing 9$  mm Laser Diodes,  $f = 6.24$  mm,  $NA = 0.40$ . Thorlabs. Especificaciones. (2017)

[4] OPT301. Integrated Photodiode and Amplifier. Burr Brown. Hoja de datos. (1994)

[5] RB13 Series. 3-Axis Translation Stage. Thorlabs. Manual de Usuario. (2015)

- [6] Stepper Motor NEMA17. PBC LINEAR. Hoja de datos. (2016)
- [7] ZFS Series. Stepper Motor Actuators. Thorlabs. Manual de Usuario. (2015)
- [8] KST101. K-Cube Stepper Motor Controller. Thorlabs. Manual de Usuario. (2018)
- [9] Laser Diode Controller. LDC200C Series. Thorlabs. Manual de Usuario. (2017)
- [10] NI 6343. X Series Data Acquisition: 500 kS/s, 32 AI, 48 DIO, 4 AO. National Instruments. Hoja de especificaciones. (2014)

## Capítulo 5 Análisis de Software

A pesar de ser un sistema que forma parte del Nanoscopio, el Software utilizado para la operación del dispositivo se verá en un capítulo por separado. Esto debido a la complejidad del análisis y documentación que se debe presentar. En este capítulo hablaremos de los programas utilizados para escribir las rutinas de operación y de procesamiento de imágenes.

### 5.1 LabVIEW (*Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*).

Es una plataforma y entorno de desarrollo para diseño de sistemas a través de un lenguaje de programación visual gráfico. Es recomendado para sistemas de hardware y software de pruebas, control y diseño, simulado, real o embebido, pues su objetivo es acelerar la productividad.

Los programas desarrollados en LabVIEW se llaman *Instrumentos Virtuales* o *VIs*, y su origen proviene del control de instrumentación, aunque actualmente también se utiliza para control de todo tipo de electrónica, programación embebida, telecomunicaciones, matemáticas, entre otros. Un gran atractivo de LabVIEW es que permite la integración de todo tipo de hardware y software, tanto del propio fabricante (*National Instruments*), como de otros fabricantes.

Al ser una herramienta gráfica de programación, los programas no requieren de mnemotécnicos para su escritura, sino que se dibujan, facilitando su comprensión. Cada VI consta de dos partes diferenciadas:

- *Panel Frontal*: Es la interfaz con el usuario, se utiliza para interactuar con el usuario final cuando el programa se encuentra en ejecución. Los datos del programa se presentan en tiempo real. Aquí se definen los controles e indicadores.
- *Diagrama de Bloques*: Es el programa propiamente dicho, donde se define su funcionalidad. Se colocan íconos que realizan una determinada función y se interconectan. Aquí también se pueden unir unos VIs con otros.

### 5.2 MATLAB (*Matrix Laboratory*)

Es un ambiente de desarrollo computacional numérico y multi-paradigma. Permite a través de un lenguaje de programación propietario de *MathWorks*, la manipulación de matrices, la graficación de funciones y datos, la implementación de algoritmos, creación de interfaces de usuario y la comunicación con programas escritos en otros lenguajes de programación.

MATLAB se utilizó originalmente como software para ingeniería de control, pero poco a poco fue encontrando aplicación en otros rubros. Actualmente se utiliza como herramienta

de enseñanza de álgebra lineal, análisis numérico y se ha vuelto muy popular en el procesamiento de imágenes.

Los programas de MATLAB se escriben utilizando el lenguaje de scripting propio de MATLAB. Comúnmente la ejecución de programas involucra el uso de la línea de comandos como un *Shell* matemático interactivo o a través de la lectura de archivos de texto con el código a ejecutar.

A pesar de que MATLAB tiene como principal objetivo el cómputo numérico, existen *toolboxes* opcionales con distintos fines y habilidades computacionales. Una de estas *toolboxes* es la de procesamiento, análisis y desarrollo de algoritmos de imágenes: *Image Processing Toolbox*. Esta proporciona un conjunto de algoritmos estandarizados de referencia y aplicación para el procesamiento, análisis y visualización de imágenes. Entre sus funciones se encuentran la segmentación y mejora de imágenes, reducción de ruido, transformaciones geométricas, entre otras. Estos algoritmos pueden ser optimizados a conveniencia del usuario mediante código o ejecutándolos en procesadores multinúcleo o GPUs.

### 5.3 Kinesis

Es una paquetería de software desarrollada por ThorLabs para proveer control flexible y accesible a través de PC para distintos tipos de motores, facilitando la automatización de procesos que los utilizan. Su interfaz de usuario brinda control completo de todas las configuraciones y modos de operación de los motores y sus controladores, permitiendo su uso sin necesidad de desarrollar software adicional. El servidor de Kinesis está diseñado para permitir la rápida creación de aplicaciones de posicionamiento automatizado.

Los controles de Kinesis son componentes reutilizables de software precompilados que proveen tanto una interfaz gráfica como una interfaz programable. La gran mayoría de estos controles están diseñados para su implementación en aplicaciones de Windows, lo que garantiza aún más su cualidad de reutilizables.

Con Kinesis, se utilizan controladores .NET para permitir el control directo de distintos controladores electrónicos. Los programas que utilizan controladores .NET usualmente se conocen como aplicaciones de cliente. Un controlador .NET es un componente de software independiente de un lenguaje de programación. Debido a esto, los controladores pueden ser incorporados a una gran variedad de entornos de desarrollo para su utilización con código propio de estos entornos sin necesidad de programar dichos controladores desde cero.

#### 5.4 El Programa Principal del Nanoscopio

Como se mencionó en el capítulo anterior, los motores se controlan a través de la interacción entre dos señales seno y coseno, las cuales generan el factor de micropasos para el desplazamiento del motor. Esta interacción consiste en alimentar una de las fases del motor con una señal seno y la otra con una señal coseno. Ambas señales deben estar desfasadas en todo momento a  $90^\circ$ . Mientras más se incrementa el factor de micropasos, la cantidad de micropasos necesarios para completar un ciclo completo de cada señal, aumenta de manera proporcional.

Para el factor de 1 micropaso se requiere que el motor avance 4 micropasos para completar el ciclo de ambas señales, como se muestra en la Figura 5.1.

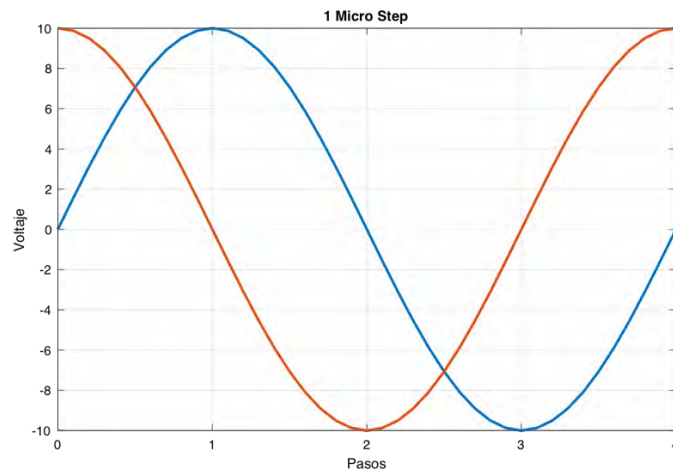
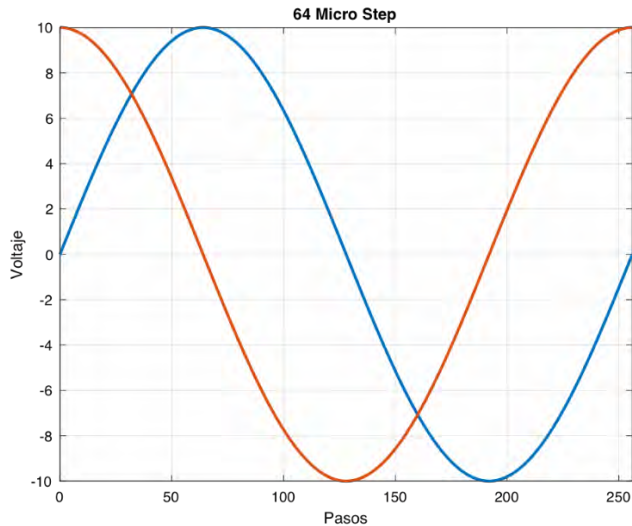


Fig. 5.1. Señales seno y coseno para 1 micropaso [1].

Para el factor de 2 micropasos, se requiere que el motor avance 8 micropasos; para el factor de 4 micropasos, se requiere que el motor avance 16 micropasos, y así sucesivamente. Finalmente, para el factor de 64 micropasos, se requiere que el motor avance 256 micropasos, como se muestra en la Figura 5.2.





**Fig. 5.2.** Señales seno y coseno para 64 micropasos [1].

El programa del Nanoscopio se basa en la interacción de estas señales para realizar un barrido sobre la muestra, a partir del cual se generará una matriz de datos y una imagen virtual de ella. Quedando el algoritmo de la siguiente forma:

1. El usuario ingresa los datos:
  - a. Número de pasos para el motor X y para el motor Y (número de pixeles).
  - b. Factor de micropasos que operará al motor X y el motor Y.
  - c. Dirección en la que se desplazará el motor X y el motor Y.
  - d. Retardo entre pasos del motor X y del motor Y.
2. Se habilitan los cuatro canales de salida analógica, asignando la señal seno a uno y la señal coseno al otro.
3. Se habilita un canal de entrada para la lectura del fotodiodo.
4. Se leen los datos ingresados por el usuario.
5. Se crea una matriz Z del tamaño ingresado.
6. Se lee la señal del fotodiodo y se mapea en  $Z[i][j]$ ,
7. El motor X avanza un paso.
8. Repite 6 y 7 hasta que el número de pixeles almacenados en [i] sea igual al número de pixeles solicitados.
9. El motor X regresa a la posición inicial.
10. El motor Y avanza un paso.
11. Repite de 6 a 10 hasta que el número de pixeles almacenados en [j] sea mayor al número de pixeles solicitados.
12. El motor Y regresa a la posición inicial.
13. Los datos almacenados en Z se guardan en un nuevo archivo .txt.

Quedando el diagrama de flujo del algoritmo anterior:

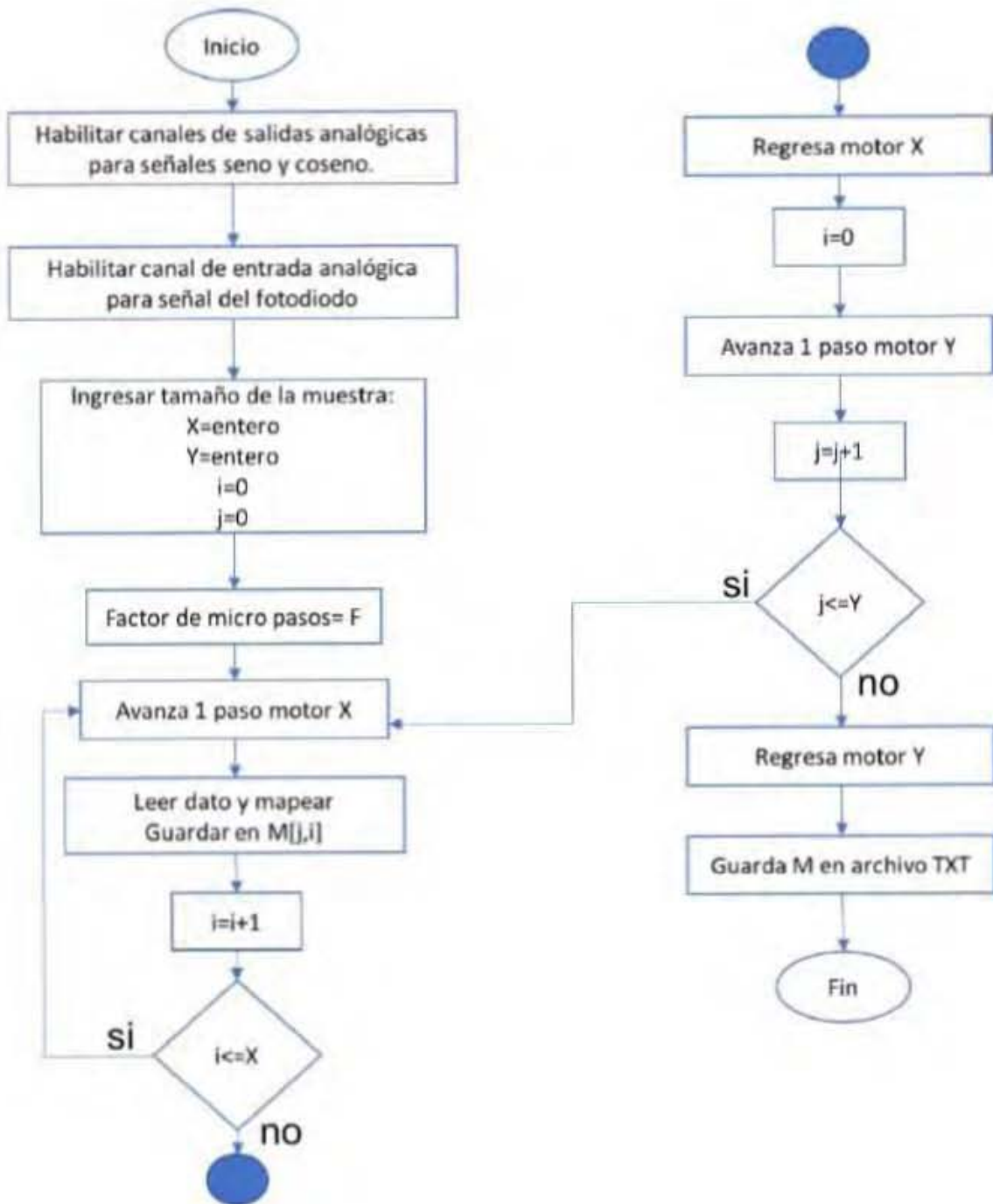


Fig. 5.3. Diagrama de flujo del programa del Nanoscopio.

Quedando de la siguiente manera el programa:

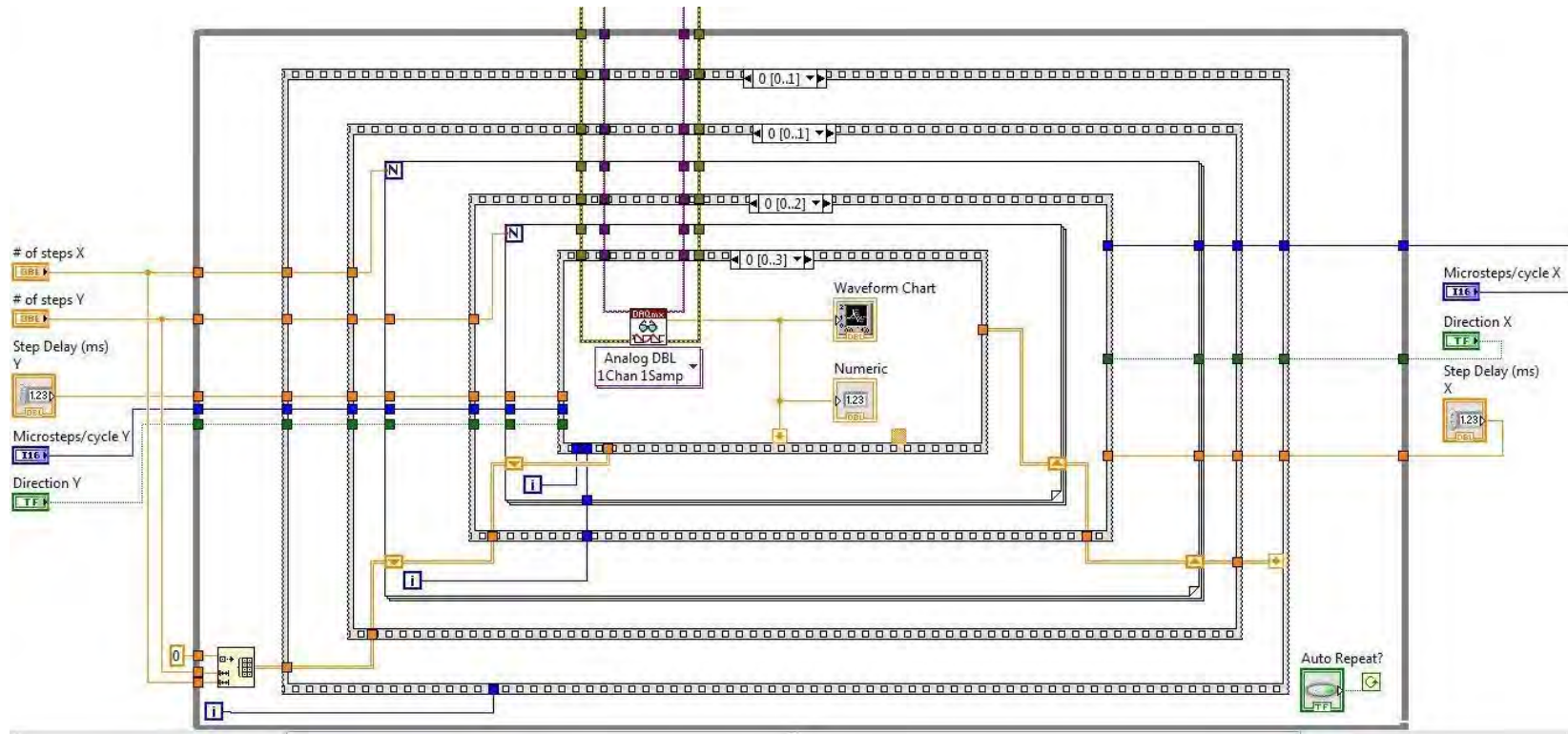


Fig. 5.4. Diagrama de bloques del programa del Nanoscopio.

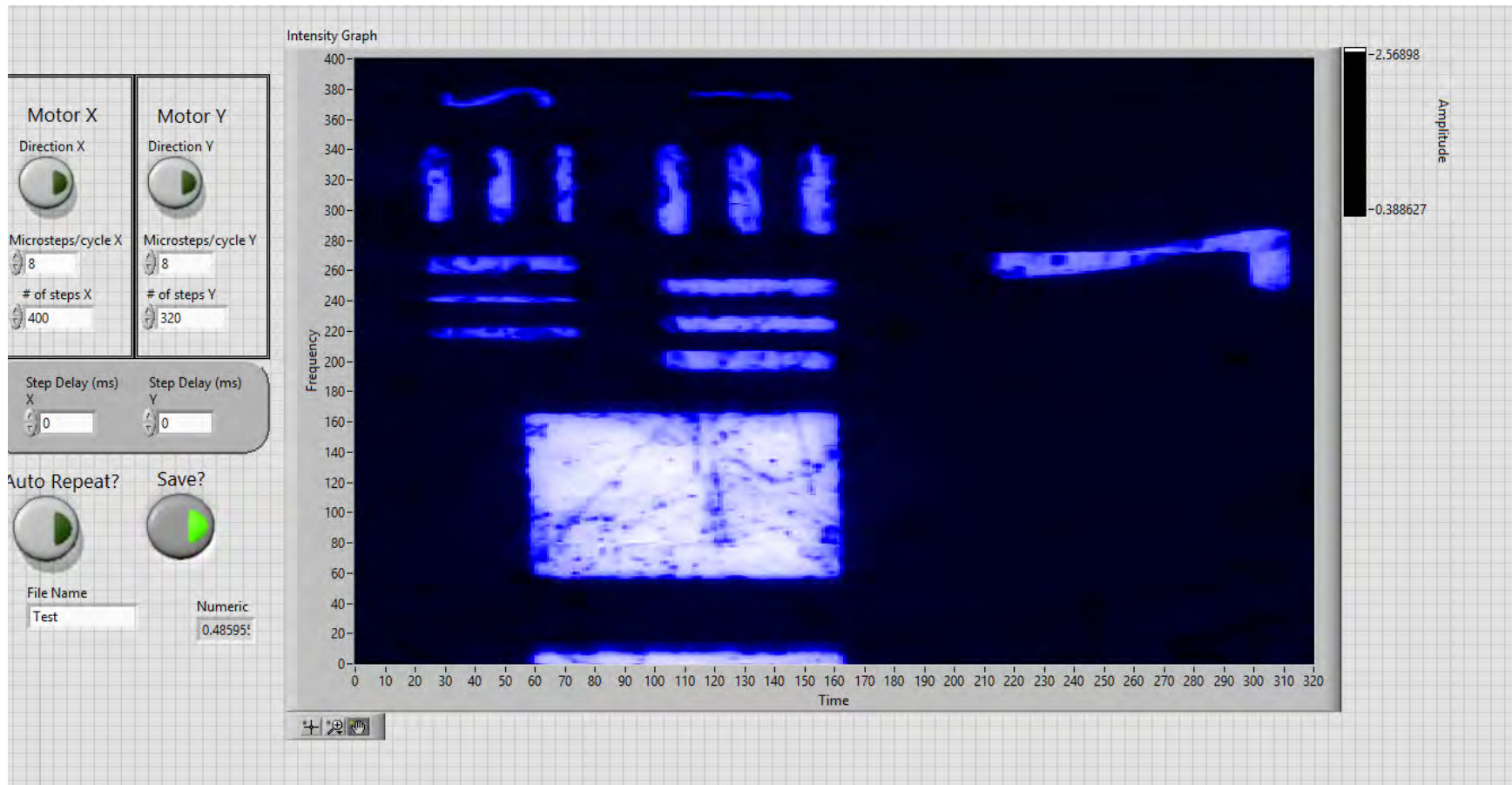


Fig. 5.5. Panel principal del programa del Nanoscopio.

A través de este programa, al usuario se le pide ingresar el nombre de la muestra que va a barrer (se recomienda agregarle una numeración para llevar un control adecuado); el factor de micropasos que operará a cada motor; el número de pixeles que tendrá la imagen; el retardo entre cada medición; si se desea repetir un escaneo de manera inmediata y finalmente si se desea guardar la matriz obtenida como un archivo .txt.

### 5.5 Implementación del eje Z a través de Kinesis en LabVIEW

Para incorporar los controladores .Net de Kinesis en un VI de LabVIEW, se siguió la arquitectura de sistema sugerida por *ThorLabs*, ver Fig. 5.6.

Esta arquitectura consta de dos componentes ajenos a LabVIEW, las interfaces de usuario de Kinesis y un servidor, cuya función será actuar como medio de comunicación entre las interfaces y el VI.

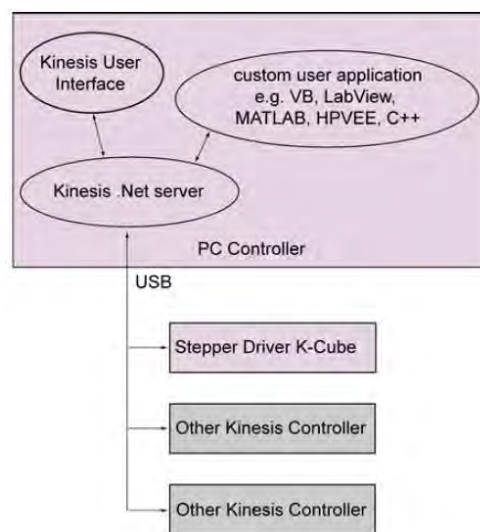


Fig. 5.6. Arquitectura de sistema sugerida.

Dentro de un proyecto nuevo en LabVIEW se copiaron todos los archivos .dll correspondientes a Kinesis, esto con la finalidad de tener todos los métodos que se pudiesen requerir en la manipulación a través del VI. LabVIEW contiene opciones preprogramadas para incorporar controladores ajenos a *National Instruments* a través de .Net, por lo que estas fueron utilizadas para importar los contenedores del KST101, ver Fig. 5.7.

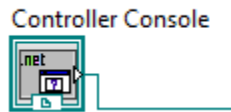


Fig. 5.7. Controlador dentro del diagrama de bloques de LabView a través de .Net.

Por sí solo, el contenedor del KST101 es inservible dentro del VI, ya que requiere de una inicialización y validación a través del número de serie del controlador. Se creó un nodo de propiedad para el contenedor, en el cual se ingresa el número de serie como una constante, ver Fig. 5.8.

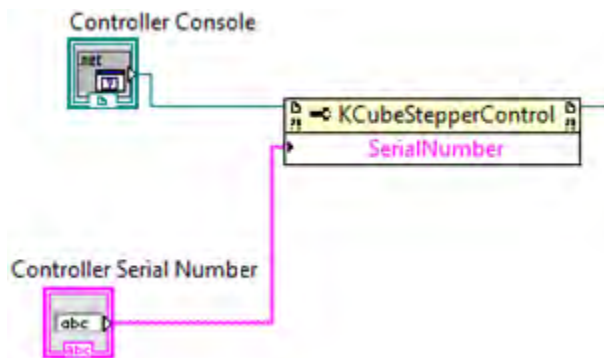


Fig. 5.8. Validación del controlador a través del Número de Serie.

El resto de los métodos del controlador de Kinesis pueden ser llamados dentro del Diagrama de Bloques a conveniencia utilizando una llamada a Invocación de Nodo .Net. El siguiente paso es dar de alta formalmente el dispositivo a utilizar dentro del VI. Para hacer esto, se necesita la función *CreateDevice*, la cual recibe como referencia el tipo de dispositivo que va a dar de alta (el KST101) y su número de serie, ver Fig. 5.9.

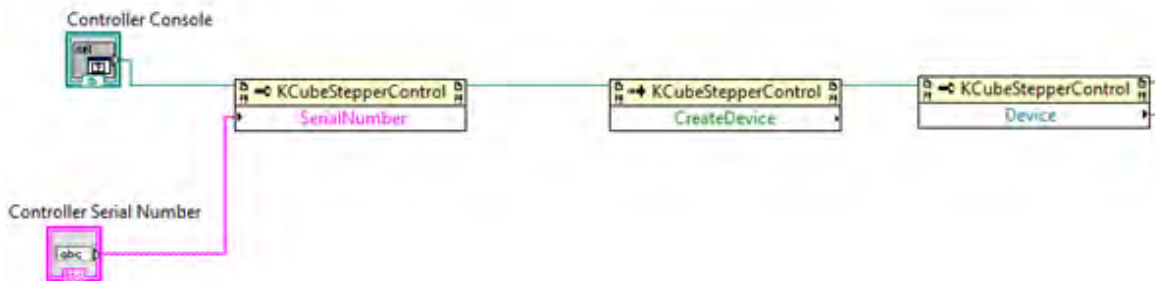
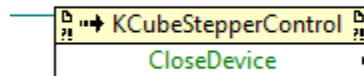


Fig. 5.9. Diagrama de funcionamiento básico para Kinesis dentro de LabView.

Con esto el VI podría funcionar a la perfección, de manera idéntica a la interfaz gráfica que Kinesis ofrece por sí solo. Sin embargo, no existe un control para detener la ejecución del

programa, lo cual podría interrumpir la comunicación con el dispositivo o terminar el programa de manera prematura. Para evitar esto, se agregó un ciclo *While* al Diagrama de Bloques, tras el cual se invocó a la función *CloseDevice*, ver **Fig. 5.10**. El ciclo *While* repite toda una sección de código encerrada dentro de una caja de ciclo *While* hasta que la condición de terminado se ha cumplido, tras la cual el ciclo se terminará y procederá a la siguiente parte del código. La función *CloseDevice* tiene como objetivo terminar todo tipo de comunicación con el hardware del KST101, asegurando que éste se desocupe de inmediato al cerrar o detener la ejecución del programa.



**Fig. 5.10.** Método para terminar comunicación entre KST101 y la computadora.

Uno de los puntos de mayor relevancia para el enfoque es conocer la posición del motor, por lo que se procedió a diseñar un indicador para ello. Se agregó un nodo adicional con la información del motor a utilizar; este nodo de propiedad, *Device*, es aquel que provee acceso a todas las funciones exclusivas del motor. Entre estas funciones, se encuentra la función *GetPositionCounter*, la cual regresa la posición relativa al engranaje del motor. Esta función se agregó al programa principal para conocer la posición del motor.

Como se mencionó en el capítulo anterior, se requieren 2184560.64 pasos del motor ZFS13B para desplazarse 1 mm.

Para convertir la posición relativa a una posición absoluta en milímetros, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\textit{Posición Relativa}}{2184560.64} = \textit{Posición Absoluta [mm]} \tag{5.1}$$

De esta manera se puede monitorear en tiempo real la posición absoluta del motor mientras se ejecuta el programa, ver **Fig. 5.11**.

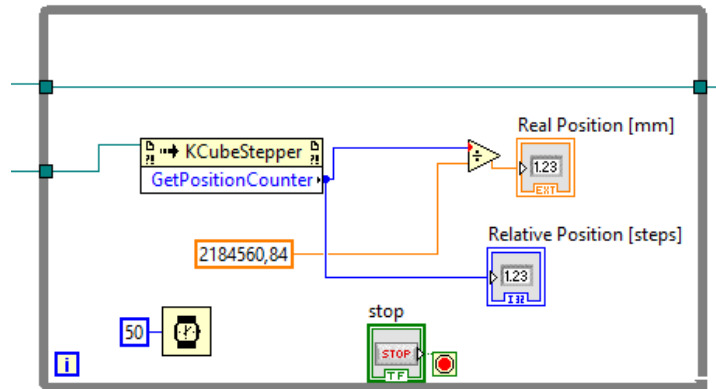


Fig. 5.11. Diagrama de bloques para monitoreo de posición absoluta de un motor.

Para garantizar que el programa siempre inicia en el mismo punto, lo primero es establecer dicha posición. En este caso existe un método llamado *Home* que traslada al motor a la posición preprogramada con el mismo nombre. Se creó una estructura plana para que el motor tenga tiempo de llegar a esa posición, debido a que el procesamiento siempre es más rápido que el movimiento mecánico, ver Fig. 5.12.

El siguiente paso es darle al motor una posición nueva a la cual llegar. El funcionamiento básico de este movimiento es el mismo que el de la estructura anterior, sin embargo, el método "Home" ya no nos sirve para esta nueva tarea. Para este movimiento se utilizó el método *SetMoveAbsolutePosition*, el cual recibe una posición absoluta en milímetros y la guarda en la memoria del controlador.

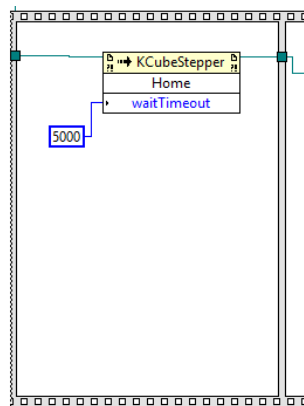


Fig. 5.12. Estructura que garantiza el inicio del programa en la posición *Home*.

Finalmente, una vez guardada esta posición, se envía la orden al motor de trasladarse con el método *MoveAbsolute*. Este método recibe dicha posición y un retraso para realizar el desplazamiento, ver Fig. 5.13.



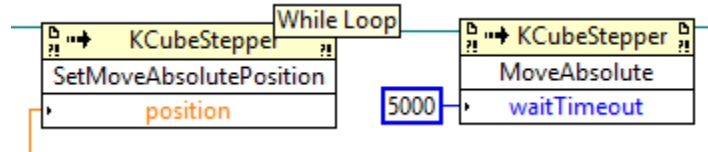


Fig. 5.13. Métodos para trasladar el motor a una posición absoluta.

El programa finalizado se ve de la siguiente manera:

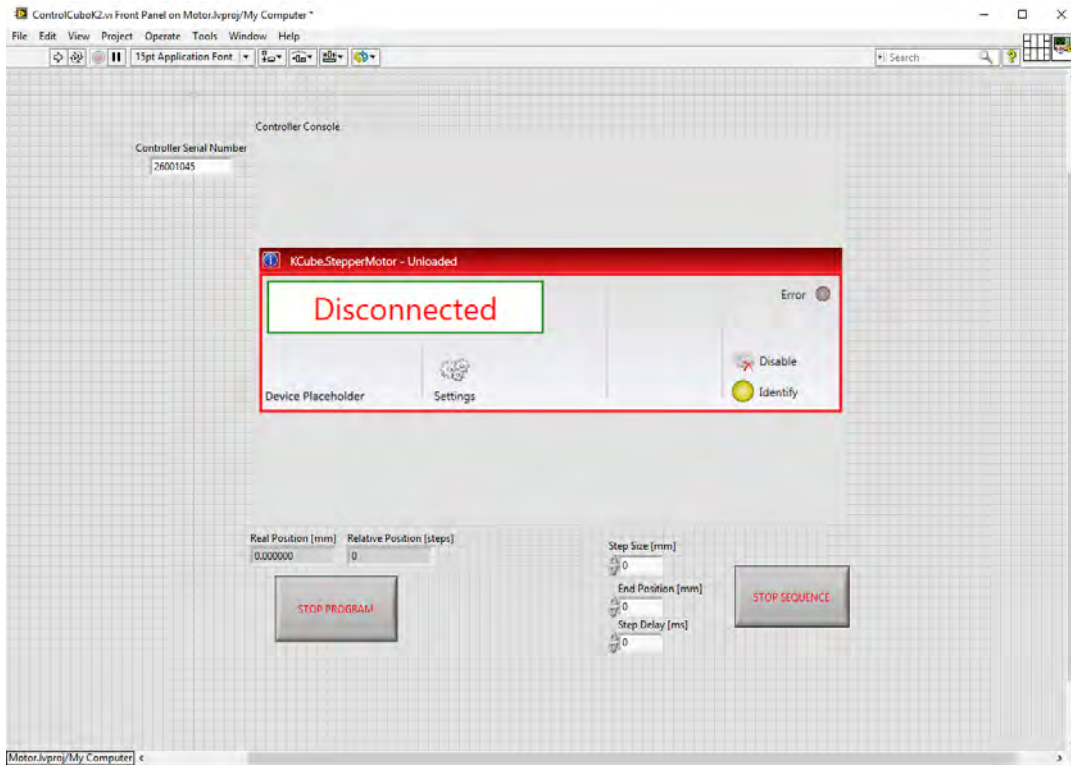


Fig. 5.14. Panel principal del programa para la operación del eje Z para ajuste del enfoque.

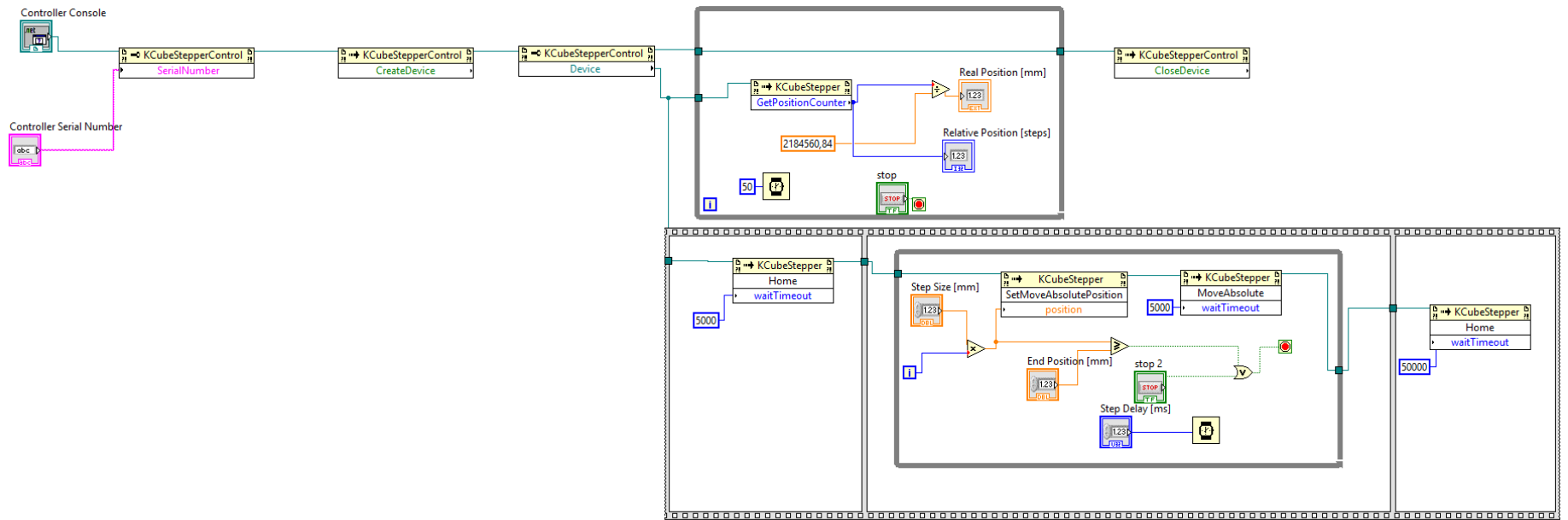


Fig. 5.15. Diagrama de bloques del programa para la operación del eje Z para ajuste del enfoque.

## 5.6 Procesamiento de imágenes

Una vez obtenidas las imágenes, es necesario procesarlas a través de distintos filtros espaciales para mejorar aspectos como el contraste, la nitidez y la cantidad de ruido; así como para discriminar si un objeto es real mediante la detección de bordes. Debido a que este trabajo no está enfocado por completo al desarrollo de filtros espaciales, se recomienda consultar la bibliografía [2-10] si es que el lector se interesa por este tema.

Los filtros espaciales tienen como objetivo modificar la contribución de determinados rangos de frecuencia en una imagen. El término espacial se refiere al hecho de que el filtro se aplica directamente a la imagen y no a una transformada de la misma, es decir, el nivel de gris de un pixel se obtiene directamente en función del valor de sus vecinos, similar a una función de correlación. La convolución es una operación a través de la cual se lleva a cabo una acción de filtrado.

Los filtros espaciales pueden clasificarse basándose en su linealidad: filtros lineales y filtros no lineales. A su vez los filtros lineales pueden clasificarse según las frecuencias que dejen pasar: filtros pasa bajas, filtros pasa altas y filtros pasa bandas.

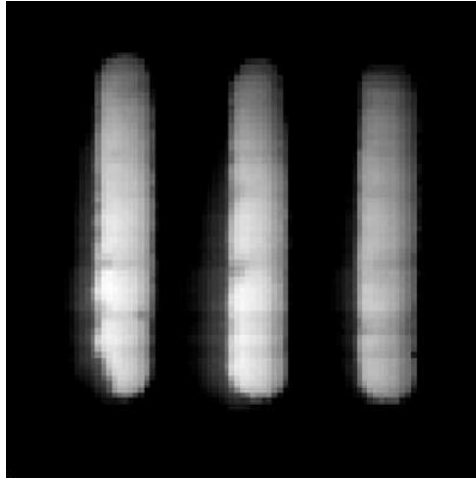
Filtros pasa bajas: son utilizados para difuminar y reducir ruido en las imágenes, a este proceso se le conoce en inglés como *smoothing*. El difuminado (*blurring*) es usado en etapas de preprocesamiento desde la eliminación de pequeños detalles hasta la extracción de objetos y rellenado de pequeños huecos en líneas y curvas.

Filtros pasa altas: Estos filtros son utilizados para detectar cambios de luminosidad. Son utilizados en la detección de patrones como bordes o para resaltar detalles finos de una imagen. En inglés son conocidos como *Sharpening Spatial Filters*.

Filtros pasa bandas: Son utilizados para detectar patrones de ruido. Debido a que generalmente eliminan demasiado contenido de una imagen casi no son usados. Sin embargo, son útiles para aislar los efectos de ciertas bandas de frecuencias seleccionadas sobre una imagen. De esta manera, estos filtros ayudan a simplificar el análisis de ruido, independientemente del contenido de la imagen.

Para demostrar el funcionamiento de los filtros realizados, se utilizará como imagen base la **Fig. 5.16**.

La rutina completa de estos filtros se encuentra en el **Apéndice B**. Esta rutina está programada en MATLAB y aprovecha las funciones del *Image Processing Toolbox*.



**Fig. 5.16.** Imagen obtenida de la plantilla de calibración USAF 1951, zona 5, subzona 6.

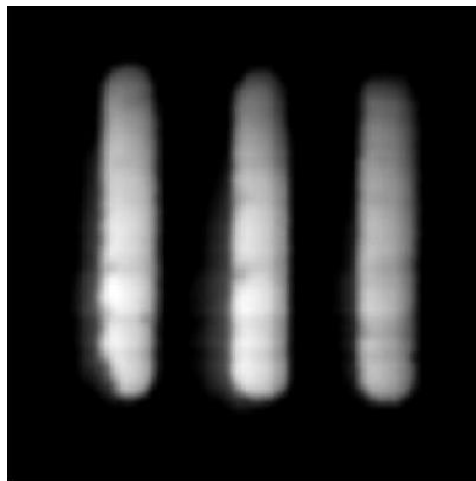
### 5.6.1 Filtro de bloque

Es un promedio de los pixeles contenidos en la vecindad de la máscara del filtro. Estos filtros son frecuentemente llamados filtros promediadores. La idea detrás de estos filtros es la de reemplazar cada pixel en la imagen por un promedio de los niveles de gris de los vecinos definidos por la máscara del filtro. Su operación es similar al de la función de correlación, sin embargo, este filtro sólo se aplica en la zona definida por la máscara del filtro.

A continuación, se presenta un ejemplo de filtro de bloque de 3 x 3:

$$\frac{1}{9} \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

Usando esta clase de filtros, se obtienen resultados como el de la **Fig. 5.17**.



**Fig. 5.17.** Imagen base procesada utilizando un filtro de bloque de 11 x 11.

Como puede apreciarse en la imagen filtrada, reduciendo la nitidez, se obtiene una imagen con menos detalles a lo largo de las barras de la plantilla.

### 5.6.2 Filtro binomial

Es común utilizar la función Gaussiana en su forma discreta a través de los filtros binomiales, ya sea utilizando la función binomial o los coeficientes del triángulo de Pascal. La función Gaussiana tiene la siguiente expresión:

$$f(x) = Ne^{-ax^2} \tag{5.2}$$

donde  $N$  es una constante de normalización en función de  $a$ , pero no de  $x$ . De forma estándar se tiene que  $a = \frac{1}{2\sigma^2}$ .

La función binomial está definida como:

$$f_N(x) = \binom{N}{x} = \frac{N!}{x!(N-x)!} \tag{5.3}$$

para  $x = 0, 1, \dots, N$ . Donde  $N$  es el orden del filtro deseado.

Usando el triángulo de Pascal:

$N$					
1			1		
2		1	2	1	
3		1	3	3	1
4	1	4	6	4	1

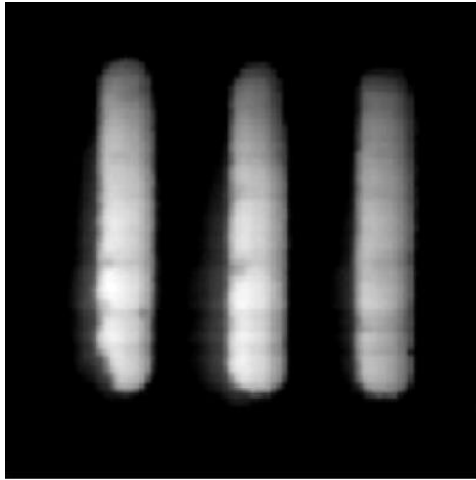
Los filtros binomiales en dos dimensiones se obtienen de la siguiente manera:

$$[f_N(x)]^T \times [f_N(x)] \tag{5.4}$$

Por lo general, esta clase de filtro se debe normalizar para no alterar la imagen, ya que, de no hacerlo, ésta se puede llegar a saturar debido a las propiedades de suma de este. Los filtros binomiales son separables, es decir, en dos dimensiones se puede aplicar un filtro de

mismo orden primero en una dirección y luego en la otra, o viceversa. La convolución de un filtro de orden  $N$  consigo mismo, produce un filtro de orden  $2N$ .

Usando esta clase de filtros, se obtienen resultados como el de la **Fig. 5.18**.



**Fig. 5.18.** Imagen base procesada utilizando un filtro binomial de  $11 \times 11$ .

Con este filtro se puede notar claramente cómo la imagen tiene detalles suavizados sin sacrificar tanto la nitidez como con el filtro de bloque.

### 5.6.3 Filtros detectores de bordes

Los filtros basados en derivadas Gaussianas fueron obtenidos originalmente de manera heurística. Sin embargo, estos tienen un fundamento matemático y comportamiento muy similar al sistema de visión del ser humano; por ello se especializan en la detección de cambios bruscos de intensidad, como lo son los bordes.

A partir de la ecuación de la función Gaussiana, se tiene que la primera derivada es:

$$f(x) = -N2a(a)e^{-ax^2} \tag{5.5}$$

y la segunda derivada:

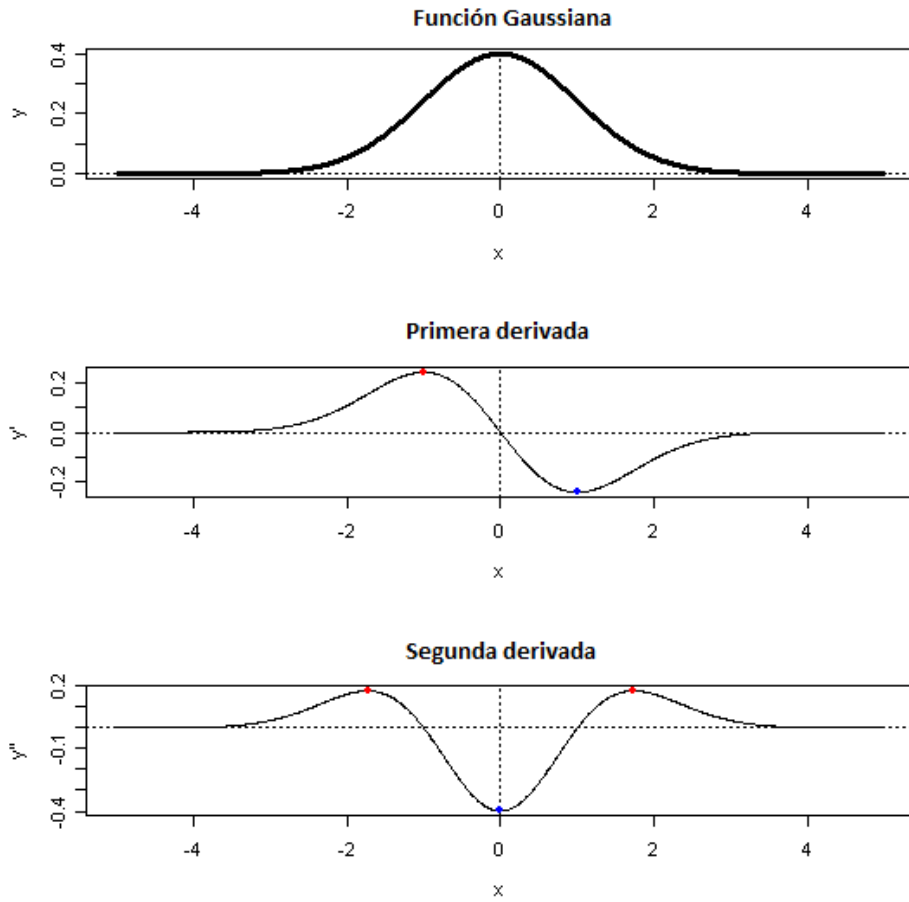
$$f(x) = N2a(2ax^2 - 1)e^{-ax^2} \tag{5.6}$$

Las derivadas de una función discreta están definidas en términos de diferenciales. La forma discreta de la primera derivada de la función Gaussiana se puede expresar de la siguiente manera:

$$f(x) - f(x - 1) \tag{5.7}$$

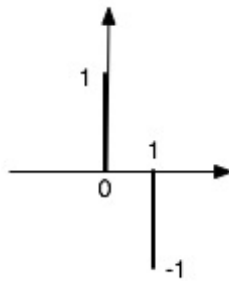
El filtro  $h(x)$  tiene la forma:

$$h(x) = \delta(x) - \delta(x - 1) \tag{5.8}$$



**Fig. 5.19.** Primeras dos derivadas de la función Gaussiana.

Y tiene la siguiente representación en el plano:



**Fig. 5.20.** Filtro  $h(x)=\delta(x)-\delta(x-1)$ .

Posteriormente puede escribirse como:

$$h(x) = [1 \quad -1] \tag{5.9}$$

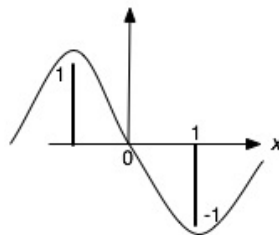
Si se agrega un cero al filtro, representando al origen:

$$h(x) = [1 \quad 0 \quad -1] \tag{5.10}$$

O bien:

$$h(x) = \delta(x + 1) - \delta(x - 1) \tag{5.11}$$

Cuya representación en el plano sería:

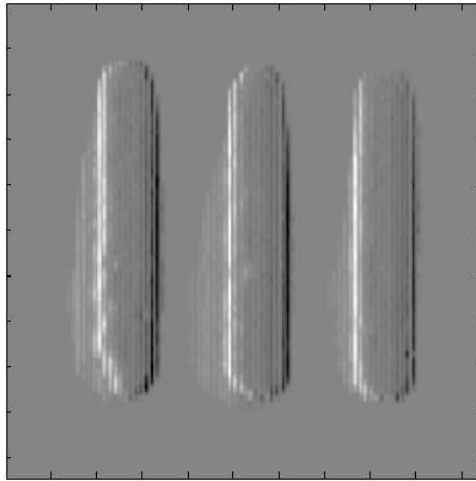


**Fig. 5.21.** Filtro  $h(x)=\delta(x+1)-\delta(x-1)$ .

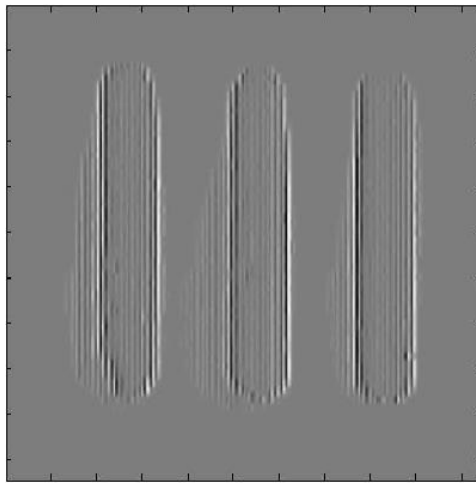
Esta representación ya posee un comportamiento discreto de la primera derivada en el plano continuo, y con ello, se tiene la posibilidad de detectar cambios en la dirección  $x$ .



Estos filtros detectores de discontinuidades o cambios, basados en derivadas Gaussianas, tienen como objetivo la detección de bordes en una imagen.



**Fig. 5.22.** Imagen base procesada utilizando un filtro detector de bordes a través de una primera derivada Gaussiana de 11 x 11.

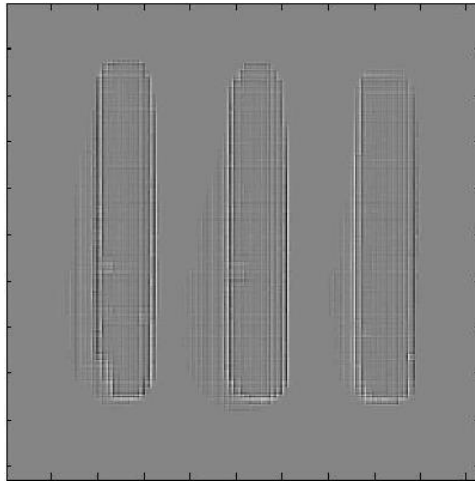


**Fig. 5.23.** Imagen base procesada utilizando un filtro detector de bordes a través de una segunda derivada Gaussiana de 11 x 11.

Como puede apreciarse en las imágenes procesadas con estos filtros, se puede detectar con mucha precisión cuando una imagen tiene un cambio brusco de intensidad, en este caso, un borde. En comparación con la imagen original, que tiene un pequeño reflejo en la parte inferior de las barras, éstas nuevas imágenes eliminan casi por completo ese reflejo, dejando únicamente presentes los bordes de las barras, con todo e imperfecciones.

Otro tipo de filtros detectores de bordes son los filtros Laplacianos. Estos no existen para una primera derivada El Laplaciano es un operador escalar formado por las segundas

derivadas en ambas direcciones (X y Y). Por lo tanto, es capaz de detectar bordes, pero no en máximos y mínimos, sino en los cruces por cero.



**Fig. 5.24.** Imagen base procesada utilizando un filtro detector de bordes Laplaciano.

Este filtro, a pesar de también ser un filtro detector de bordes, no tiene tanta resolución como los filtros basados en derivadas Gaussianas. Como puede apreciarse en la imagen, la cuadratura de los pixeles es obvia, a diferencia de todos los demás filtros que respetan los elementos curvos.

#### 5.6.4 Filtros unsharp masking

Si se quisiera buscar una traducción para esta clase de filtros, podría interpretarse como *enmascaramiento borroso*. Se basa en tener una imagen borrosa (con una pendiente pequeña), y se le resta una pendiente aún más pequeña ( $f_{PB}$ ). Esto a su vez va multiplicado por un factor  $k$  el cual se recomienda tome valores entre 1 y 3.

Después se suma la señal de diferencia con la original para obtener una pendiente mayor y por lo tanto una mejor resolución. Esto se puede expresar como:

$$k[f(x, y) - f_{PB}(x, y)] + f(x, y) = f(x, y) * h_{UM} \tag{5.12}$$

donde  $h_{UM}(x, y)$  está definido como:

$$h_{UM}(x, y) = \delta(x, y) + k\delta(x, y) - kh_{PB}(x, y) \tag{5.13}$$

Quedando la forma final de los filtros *unsharp masking* como:

$$h_{UM}(x, y) = (1 + k)\delta(x, y) - kh_{PB}(x, y) \quad (5.14)$$

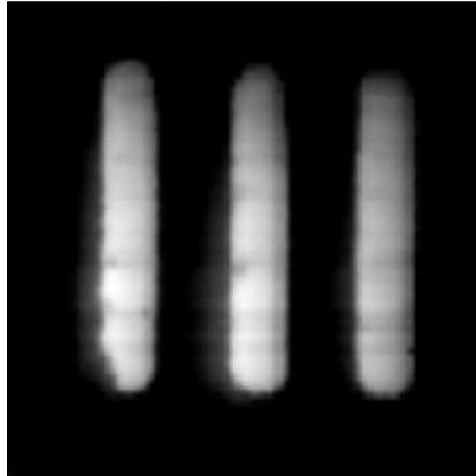


Fig. 5.25. Imagen base procesada utilizando un filtro *unsharp masking* de  $7 \times 7$ .

Este tipo de filtros son lo contrario a los filtros pasa bajas, ya que, en vez de bajar la nitidez para eliminar el ruido, estos aumentan un poco el ruido de la imagen para mejorar considerablemente la nitidez

Estos filtros, trabajando en conjunto, son una herramienta poderosa para mejorar distintos aspectos de las imágenes obtenidas en el Nanoscopio.

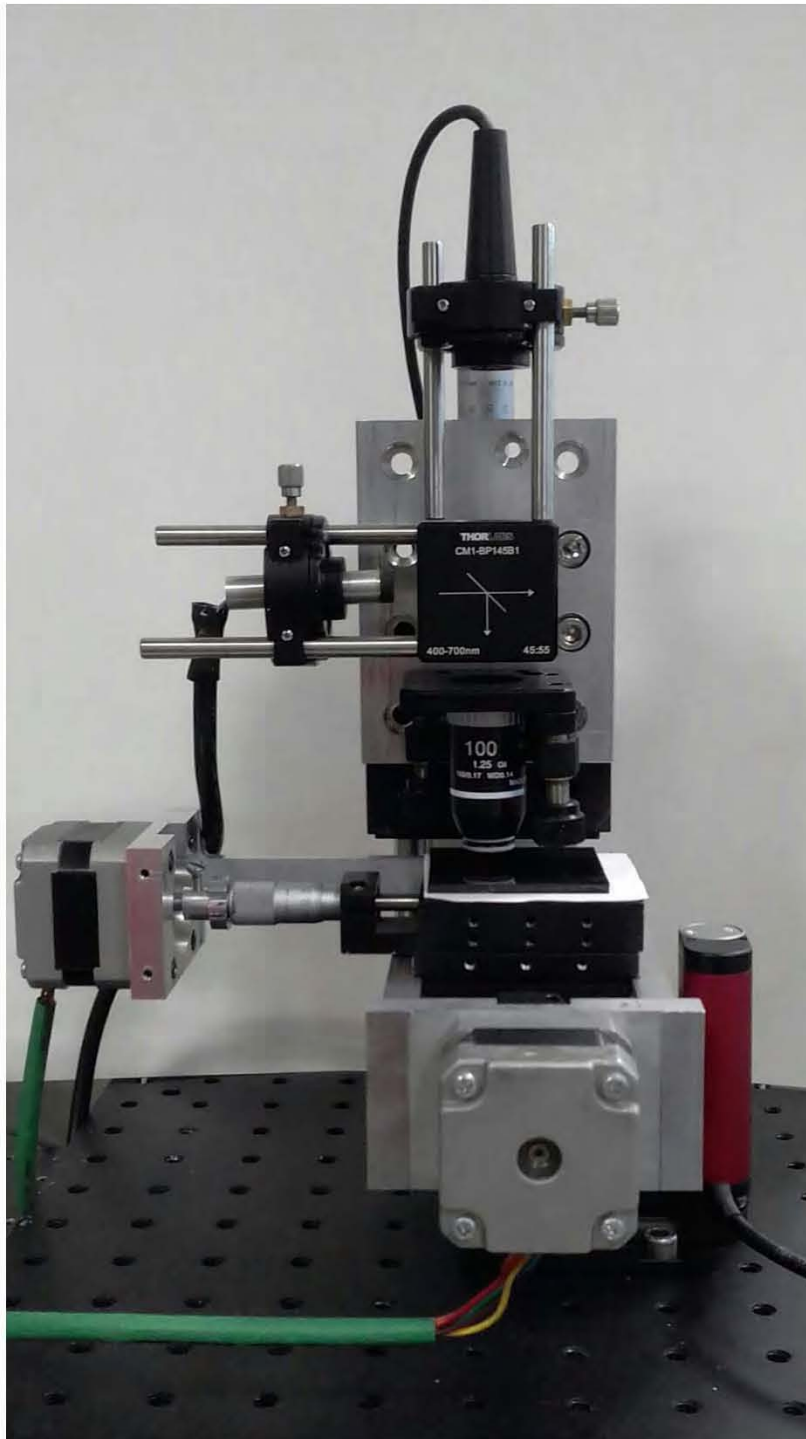
### *Referencias del capítulo*

- [1] E. Aguilar-Mendoza. Integración de la señal óptica para obtener imágenes de nanotecnología. Tesis de Licenciatura. UNAM. 2017. Capítulo 4.
- [2] Boris Escalante Ramírez. Procesamiento Digital de Imágenes. 2006. <http://verona.fi-p.unam.mx/boris/>
- [3] R.C. González. Digital Image Processing. Prentice Hall. 3rd ed. 2008.
- [4] R.C. Gonzalez. Digital Image processing using MATLAB. R.C. Gonzalez. Gatesmark Publishing. 2nd ed. 2009.
- [5] M. Petrou. Image Processing: The Fundamentals 2nd ed. Wiley and Sons Ltd. 2010.
- [6] M. Petrou. Dealing with texture 2nd ed. Wiley and Sons Ltd, 2010.
- [7] W. K. Pratt. Digital Image Processing. Wiley-Interscience. 4<sup>th</sup> ed. 2007.

- [8] A. K. Jain. Fundamentals of Digital Image Processing. Prentice Hall. 1989.
- [9] J. Lira. Introducción al Tratamiento Digital de Imágenes. Fondo de Cultura Económica. 2002.
- [10] W. R. Hendee. The Perception of Visual Information. Springer-Verlag. 2<sup>nd</sup> ed. 1997.

## Capítulo 6 Resultados y Discusión

El arreglo experimental final del dispositivo es el siguiente:



**Fig. 6.1.** Arreglo experimental del Nanoscopio de Barrido Óptico por Luz (NOBL).

Para probar las capacidades, fortalezas y debilidades del Nanoscopio desarrollado, se utilizaron varias muestras de distintas naturalezas.

Como parte del proceso de filtrado y análisis de las muestras antes mencionadas, se utilizará la calibración previamente realizada en [1]. Dicha calibración consta de los valores de la **Tabla 6.1**.

Factor de micropasos	Tamaño del paso
1	2.32 $\mu\text{m}$
2	1.302 $\mu\text{m}$
4	625.2 nm
8	325.83 nm
16	170 nm
32	115.26 nm
64	56.153 nm

**Tabla 6.1.** Valores de Calibración del Nanoscopio.

Para comparar los resultados obtenidos tras el desarrollo de los filtros espaciales, así como de la optimización de la respuesta del OPT<sub>301</sub>, se realizó un barrido a la escala más pequeña de la plantilla de calibración USAF 1951.

La USAF 1951 es un patrón de calibración conforme al estándar MIL-STD-150A, establecido por la Fuerza Aérea de los E.U.A. en 1951. A pesar de que este estándar se canceló en 2006, esta plantilla sigue siendo utilizada y aceptada en la calibración de microscopios, cámaras y escáneres digitales. Los patrones consisten en tres barras que van desde dimensiones relativamente grandes a otras relativamente pequeñas. La barra más pequeña que el dispositivo a calibrar no pueda resolver, es la limitante de su resolución.

Las barras tienen la siguiente longitud en micras [2]:

Elemento	Grupo									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	500.00	250.00	125.00	62.50	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98
2	445.45	222.72	111.36	55.68	27.84	13.92	6.96	3.48	1.74	0.87
3	396.85	198.43	99.21	49.61	24.80	12.40	6.20	3.10	1.55	0.78
4	353.55	176.78	88.39	44.19	22.10	11.05	5.52	2.76	1.38	0.69
5	314.98	157.49	78.75	39.37	19.69	9.84	4.92	2.46	1.23	0.62
6	280.62	140.31	70.15	35.08	17.54	8.77	4.38	2.19	1.10	0.55

**Tabla 6.2.** Largo de las barras de la plantilla de calibración USAF 1951.

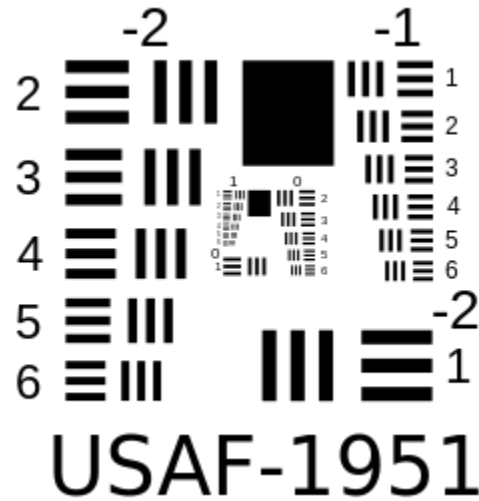


Fig. 6.2. Plantilla USAF 1951.

La zona más pequeña disponible en la USAF 1951 es la correspondiente al Grupo 7, Elemento 6.

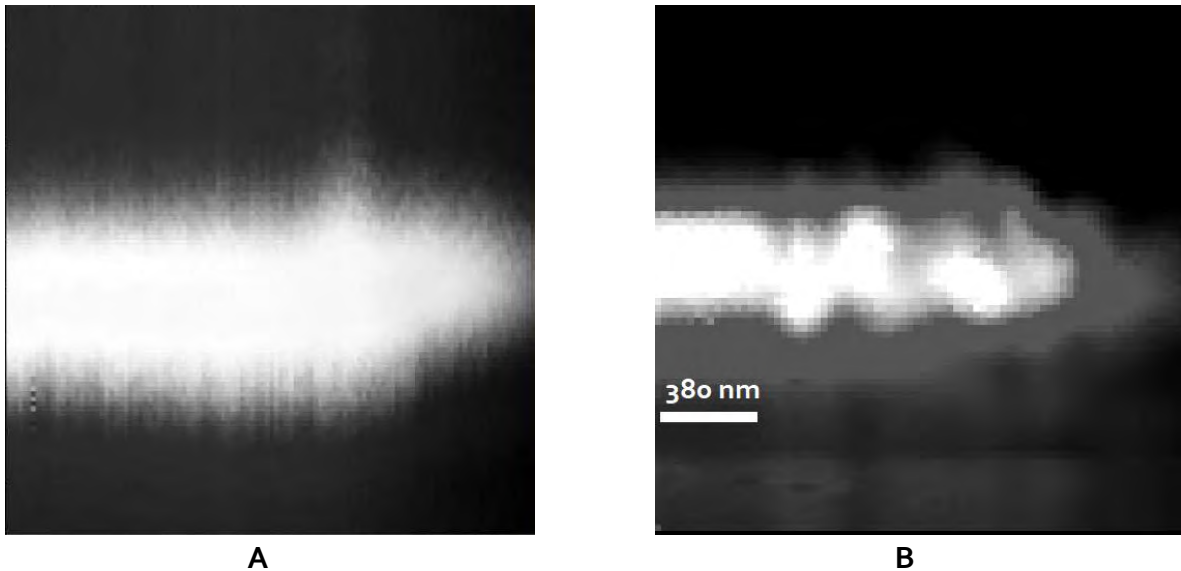


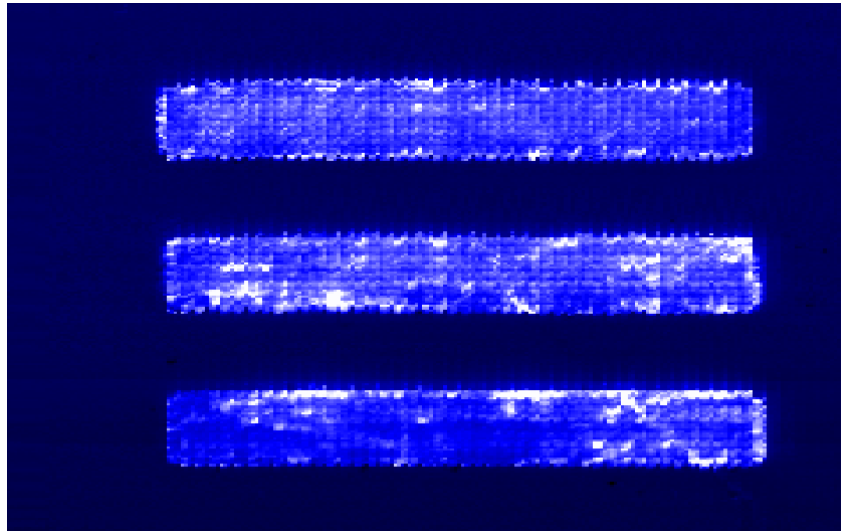
Fig. 6.3. Imagen obtenida a 56.15 nm por pixel.

- A. Imagen obtenida con un fotodiodo FDS100, sin filtrado espacial.
- B. Imagen obtenida con el fotodiodo OPT301, con filtrado espacial.

Como puede apreciarse en la **Figura 6.3**, tras la incorporación del fotodiodo OPT301 y del procesamiento a través de los filtros espaciales presentados en el capítulo anterior, la nitidez y el contraste del Nanoscopio han sido mejorados considerablemente. En ambas imágenes podemos notar que la barra no es un rectángulo ovalado perfecto. Sin embargo, en la imagen obtenida con el nuevo arreglo experimental, podemos notar que la barra tiene

irregularidades circulares a lo largo de su estructura; estas irregularidades probablemente se deriven de la forma en la que la plata fue depositada durante la elaboración de la plantilla.

Adicionalmente se desarrolló un sistema de barrido XY a través de motores ZFS13B. Este sistema utilizaba como base el programa de movimiento del eje Z. Sin embargo, debido a distintos factores tanto mecánicos, como térmicos, dicho sistema no tuvo la respuesta que se esperaba dadas sus características. El algoritmo, así como los valores de calibración obtenidos con este sistema de barrido, se presentan en el **Apéndice C**.



**Fig. 6.4.** Imagen obtenida a través del sistema de barrido XY con los motores ZFS13B a 477 nm por pixel.

Como puede observarse en la **Figura 6.4**, en las imágenes obtenidas por debajo de 1 micra por pixel se aprecian patrones cuadrículados a lo largo de ella. Esta cuadrícula no aparece en imágenes a escalas superiores. Se cree que aparece debido al calentamiento que los ZFS13B tienden a generar al operar de manera continua, dando como resultado una histéresis no controlable.

**Las muestras barridas se dividirán en dos grupos: Muestras Biológicas y No Biológicas.**

**Las muestras biológicas están compuestas por:** Polen para consumo humano, células de cáncer cervicouterino (HeLa) y células de cáncer de pulmón (H1299).

**Las muestras no biológicas están compuestas por:** Hojuelas de grafito y un microprocesador Intel i486 SX.

Para un análisis más completo, se presentarán las imágenes crudas (sin filtrar) y filtradas de cada muestra, así como imágenes de otros tipos de microscopía para su comparación.



## 6.1 Muestras Biológicas

Para todas las muestras biológicas barridas hubo que tener una consideración especial: Al tratarse de compuestos orgánicos, se desconocía si la longitud de onda del dispositivo podía dañarlos, por lo que la intensidad del haz se mantuvo por debajo de la máxima.

### 6.1.1 Polen para Consumo Humano

Es el nombre colectivo de los granos que producen las plantas con semilla, cada uno de los cuales contiene un microgametofito. Una variedad de productores apícolas ha comenzado a vender polen para el consumo humano, usualmente publicitado como un alimento saludable. El polen contiene agua, aminoácidos, proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales, vitaminas, enzimas y otros micronutrientes. La composición y el tamaño depende de la especie, oscilando entre los 6 y los 100  $\mu\text{m}$  [3].

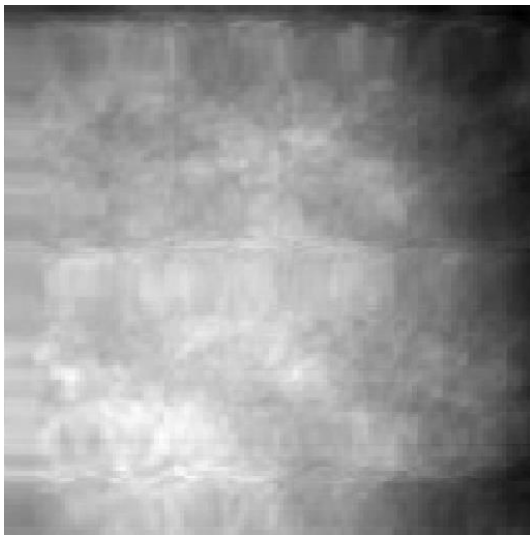


Fig. 6.5. Imagen cruda a 56.15 nm por pixel de un grano de polen.

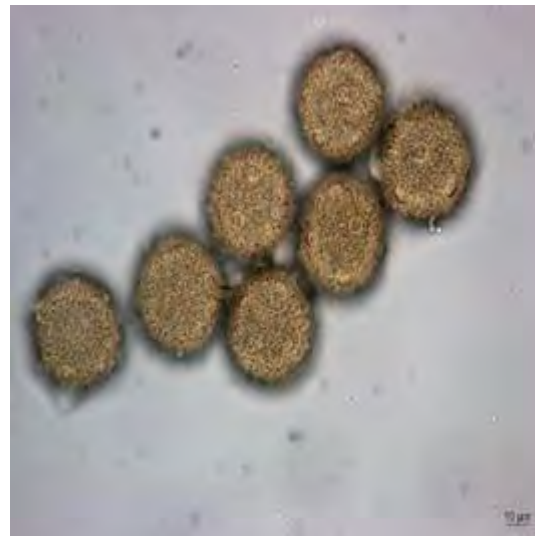


Fig. 6.6. Imagen óptica amplificada a 100X de granos de polen [4].

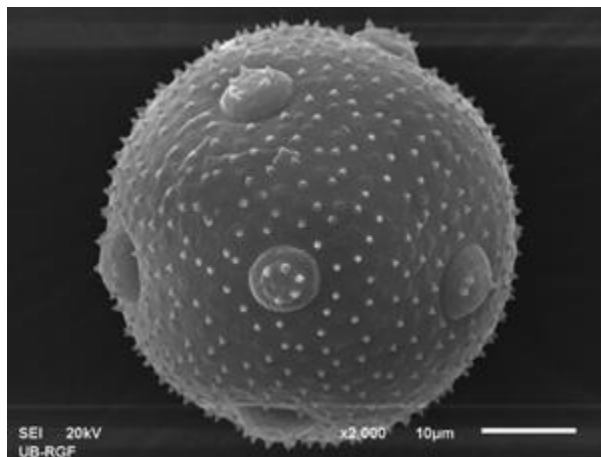
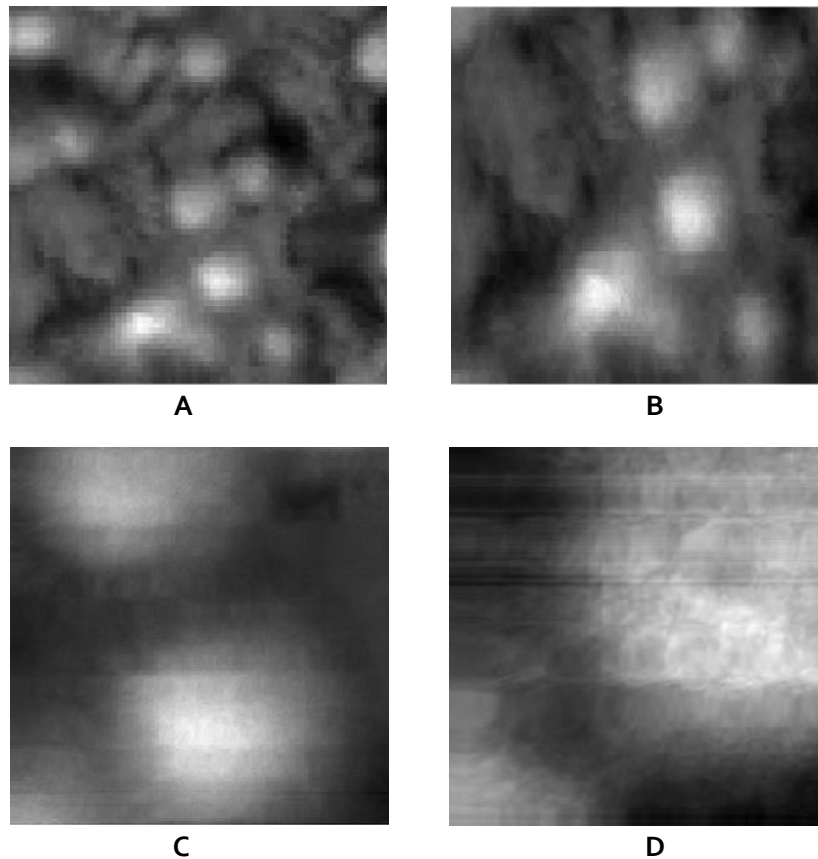


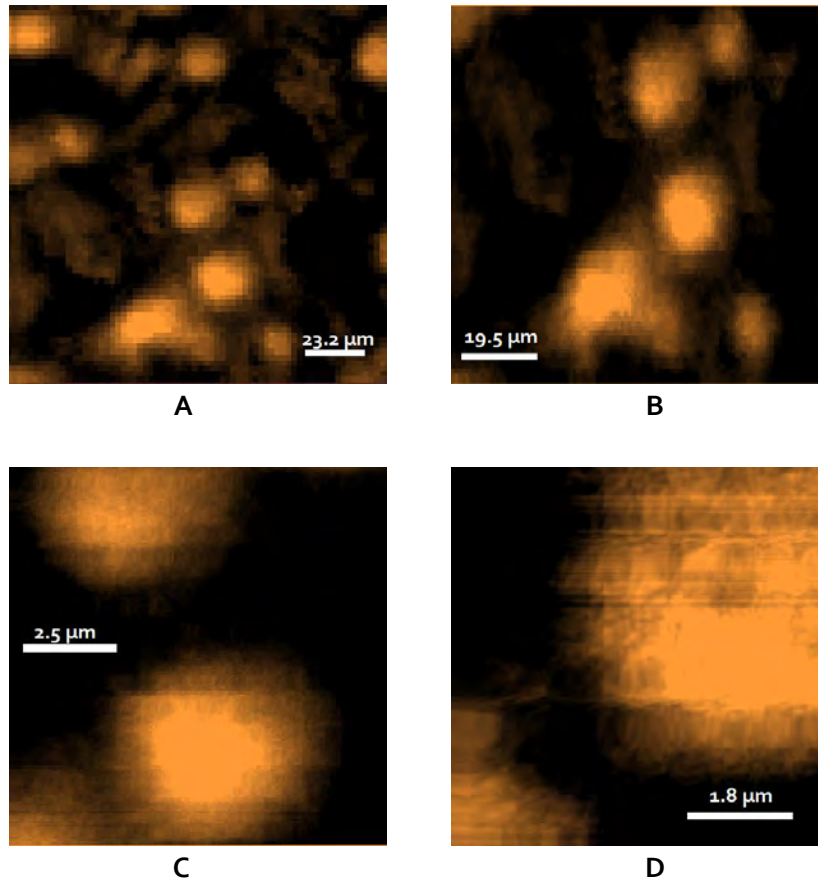
Fig. 6.7. Imagen de SEM de un grano de polen [4].

A través de SEM, algunos detalles invisibles ante un microscopio óptico de los granos de polen son descubiertos; en particular la exina (la capa que recubre al grano) y los poros distribuidos a lo largo de ella, ver **Fig. 6.7**. En la microscopía óptica pueden verse algunos de estos detalles, pero no con claridad, ver **Fig. 6.6**. Finalmente, a través de la imagen obtenida en el Nanoscopio presentado, se distinguen algunos de los detalles de la exina y unos cuantos poros, ver **Fig. 6.5**.

Para esta muestra, las imágenes que se presentan en color gris son las imágenes crudas, mientras que las naranjas son las que ya han sido filtradas.

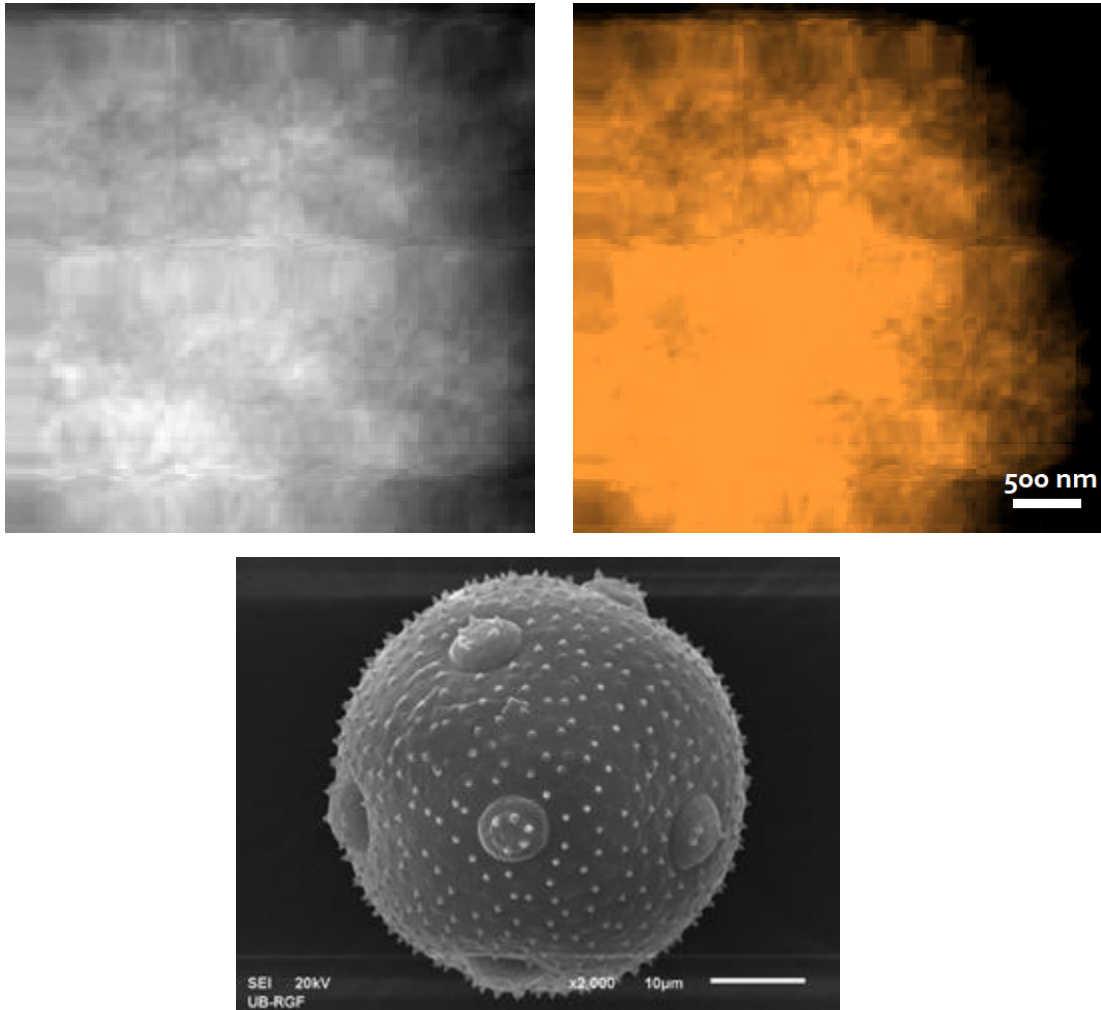


**Fig. 6.8.** Imágenes crudas de granos de polen a distintos factores de micropaso.  
**A.** Imagen cruda de varios granos de polen a 1 micropaso de 232 x 232  $\mu\text{m}$ . **B.** Imagen cruda de varios granos de polen a 4 micropasos de 195 x 195  $\mu\text{m}$ . **C.** Imagen cruda de un par de granos de polen a 8 micropasos de 30 x 30  $\mu\text{m}$ . **D.** Imagen cruda de dos granos de polen a 32 micropasos de 25 x 25  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 6.9.** Imágenes filtradas de granos de polen a distintos factores de micropaso.  
**A.** Imagen filtrada de varios granos de polen a 1 micropaso de  $232 \times 232 \mu\text{m}$ . El fondo se elimina casi por completo. **B.** Imagen filtrada de varios granos de polen a 4 micropasos de  $195 \times 195 \mu\text{m}$ . Reduciendo la zona de barrido, las siluetas de los granos se distinguen mejor. **C.** Imagen filtrada de un par de granos de polen a 8 micropasos de  $30 \times 30 \mu\text{m}$ . La exina comienza a notarse en los granos barridos. **D.** Imagen filtrada de dos granos de polen a 32 micropasos de  $25 \times 25 \mu\text{m}$ . La exina y los poros son notorios.

A través del filtrado espacial de las imágenes crudas de los granos de polen se reduce considerablemente el ruido de fondo en la imagen, mejorando su nitidez, ver **Fig. 6.9**. Gracias a este proceso, la exina puede distinguirse de manera clara, con lo que uno puede discriminar exitosamente un grano de polen de otro.

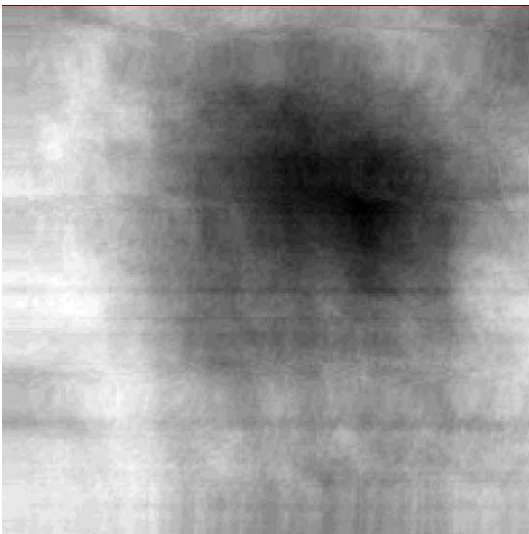


**Fig. 6.10.** Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 56.15 nm por pixel de  $5 \times 5 \mu\text{m}$  con la imagen obtenida a través de SEM [4].

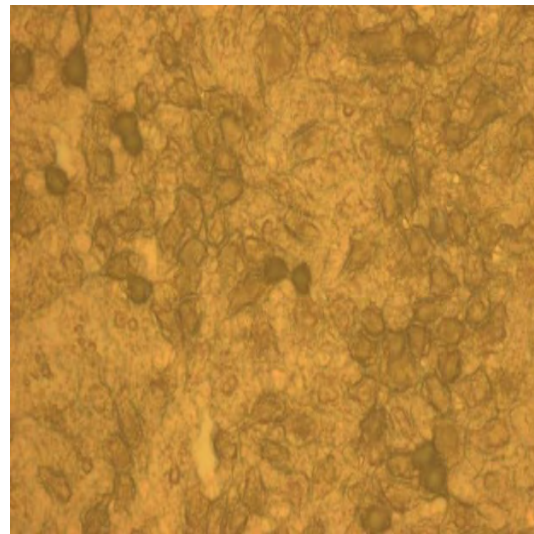
Los granos de polen son un buen ejemplo de la necesidad y utilidad de los filtros espaciales para el refinado de la imagen. Por ejemplo, gracias a los filtros se logra discriminar a la perfección un grano de otro cuando se barre una zona amplia de la muestra. Además, a altas resoluciones mecánicas, los detalles de la exina comienzan a asemejarse a los visibles mediante SEM, superando por mucho a la microscopía óptica convencional, ver **Fig. 6.10**.

### 6.1.2. Células de Cáncer Cervicouterino (HeLa)

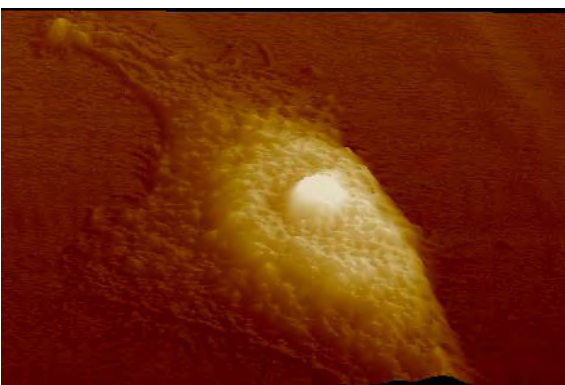
HeLa es una línea celular comúnmente utilizada en la investigación científica, siendo la línea humana más antigua. Esta línea se deriva del cáncer cervicouterino de la paciente Henrietta Lacks, quien falleció en octubre de 1951. El biólogo celular, George Otto Gey, encontró la manera de mantenerlas vivas, aislar una sola célula y multiplicarla, desarrollando así esta línea [5]. Estas células se proliferan de una manera alarmantemente rápida, más inclusive que otras células cancerígenas; debido a esto, son consideradas de las más agresivas relacionadas con el cáncer. Esta línea celular se caracteriza por medir entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro [6].



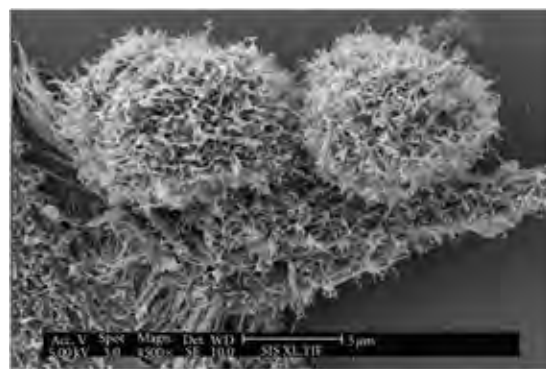
**Fig. 6.11.** Imagen cruda a 170 nm por pixel de una célula HeLa.



**Fig. 6.12.** Imagen óptica a 100X de un conjunto de células HeLa.



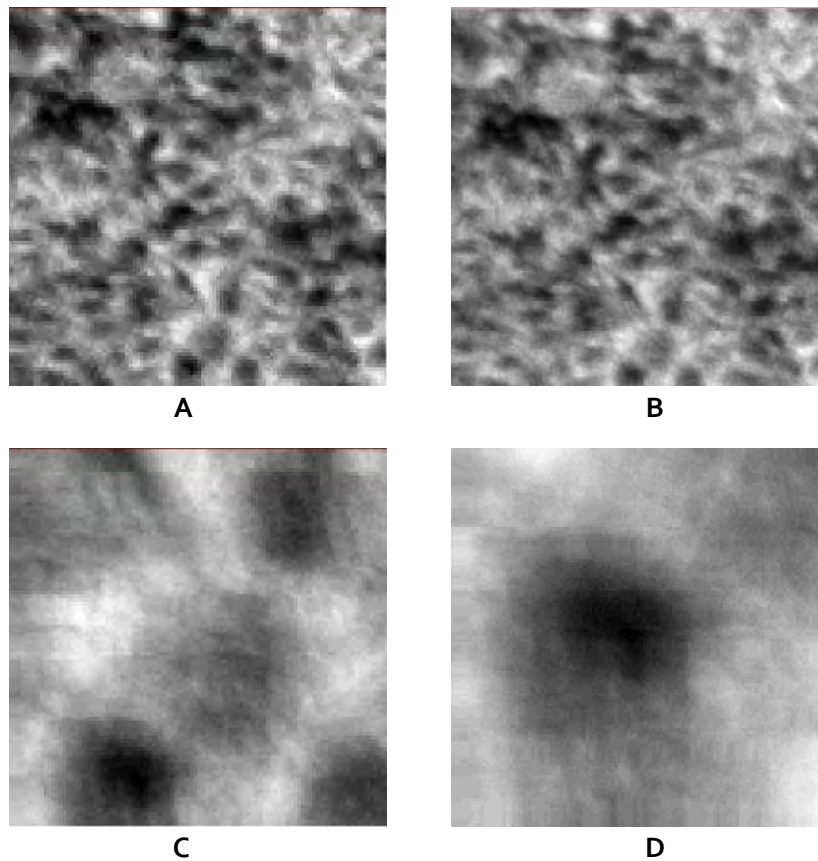
**Fig. 6.13.** Imagen de AFM de una célula HeLa [7].



**Fig. 6.14.** Imagen SEM de un par de células HeLa [8].

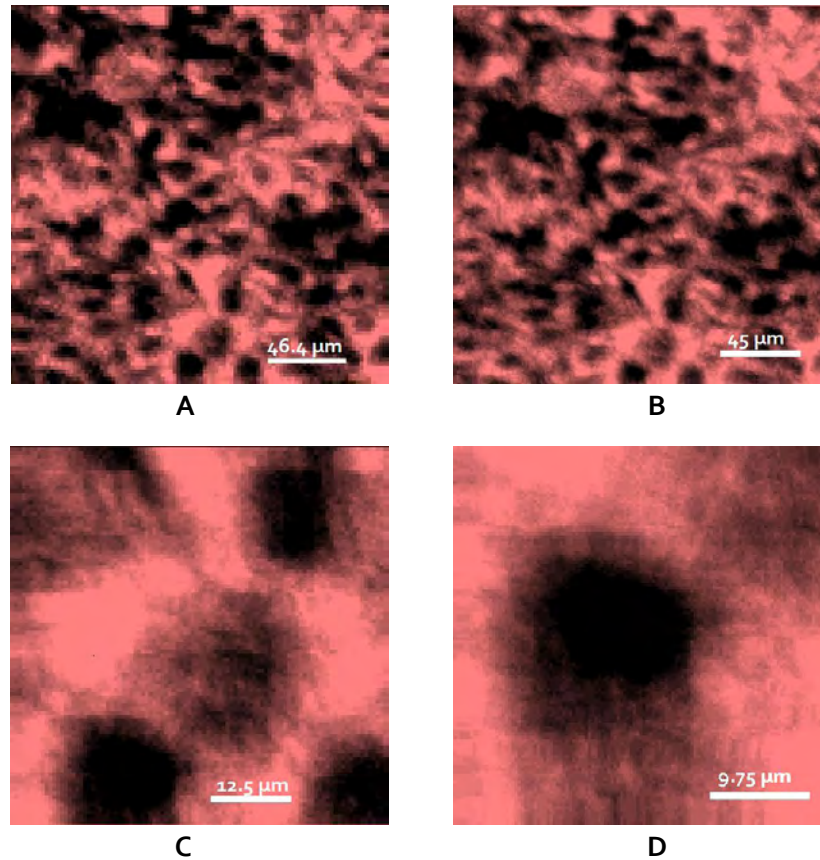
Para este tipo de muestras se tuvo que regular cuidadosamente la intensidad del haz incidente, ya que, así como con la muestra de polen, al tratarse de un compuesto orgánico, podían dañarse con facilidad. El reto en el análisis de esta muestra fue corroborar si las prolongaciones de la membrana (la apariencia similar a la de una pelusa en la **Fig. 6.14**) que se visualizan a través de SEM también aparecían al barrerse con el Nanoscopio; así como corroborar si era posible visualizar el núcleo, el nucléolo o algunos organelos de la célula como se logra visualizar mediante AFM. A través de AFM, ver **Fig.6.13**, tanto el núcleo como el nucléolo se pueden discriminar, mientras que las prolongaciones de membrana dependen del medio en el que fueron fijadas. A su vez, mediante microscopía óptica, ver **Fig. 6.12**, lo único que se puede discriminar con seguridad son los núcleos celulares.

Las imágenes crudas de esta muestra se presentan de color gris, mientras que las imágenes filtradas se presentan en color rosa.



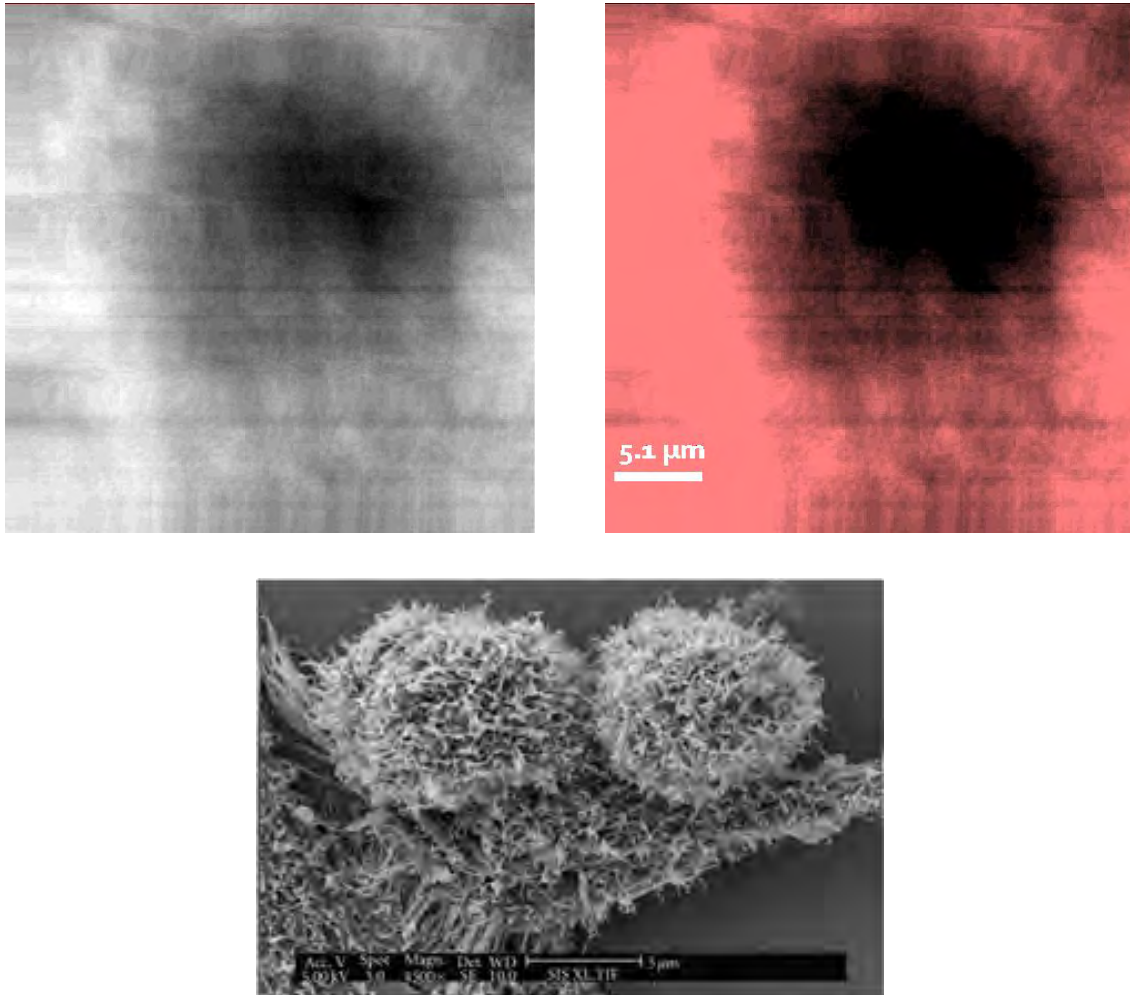
**Fig. 6.15.** Imágenes crudas de células HeLa a distintos factores de micropaso.

**A.** Imagen cruda de un conjunto de células HeLa a 1 micropaso de 232 x 232 μm. **B.** Imagen cruda de un conjunto de células HeLa a 2 micropasos de 230 x 230 μm. **C.** Imagen cruda de varias células HeLa a 4 micropasos de 62 x 62 μm. **D.** Imagen cruda de una célula HeLa a 8 micropasos de 39 x 39 μm.



**Fig. 6.16.** Imágenes filtradas de células HeLa a distintos factores de micropaso. **A.** Imagen filtrada de un conjunto de células HeLa a 1 micropaso de  $232 \times 232 \mu\text{m}$ . El contraste se ha invertido. El color es el fondo y las células son las de color negro. **B.** Imagen cruda de un conjunto de células HeLa a 2 micropasos de  $230 \times 230 \mu\text{m}$ . Los núcleos de las células se definen con claridad. **C.** Imagen cruda de varias células HeLa a 4 micropasos de  $62 \times 62 \mu\text{m}$ . Las extensiones de membrana se hacen presentes. La célula de en medio se encuentra a la mitad del proceso de mitosis celular. **D.** Imagen cruda de una célula HeLa a 8 micropasos de  $39 \times 39 \mu\text{m}$ . El núcleo y las extensiones de la membrana pueden identificarse con facilidad.

A través del barrido de este conjunto de células, se puede apreciar en todas las imágenes obtenidas que el Nanoscopio es capaz de detectar los núcleos de manera individual y colectiva. Debido a que este tipo de muestra absorbe la longitud de onda de operación, en vez de que las zonas coloreadas sean las correspondientes a partes de ella, ahora corresponden al fondo; mientras que las zonas oscuras, o negras, le corresponden a la muestra. Como se observa en la **Fig. 6.16.C**, el Nanoscopio es capaz de detectar a un par de células a la mitad del proceso de mitosis celular.



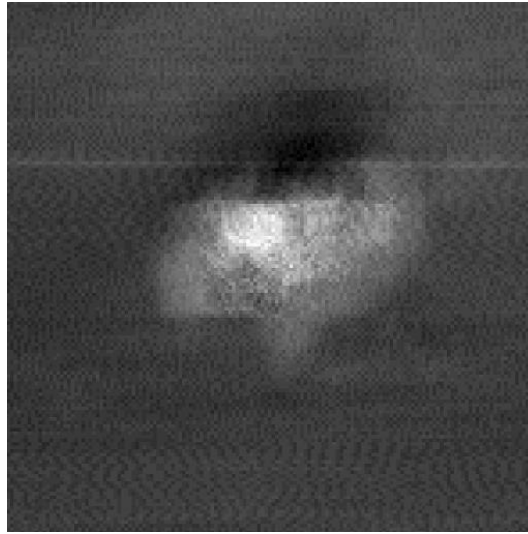
**Fig. 6.17.** Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 170 nm por pixel de 34 x 34  $\mu\text{m}$  con la imagen obtenida a través de SEM [8].

Como puede verse en la **Fig. 6.17**, las extensiones de membrana alcanzan a percibirse. Nuevamente podemos considerar el proceso de filtrado espacial como parte fundamental del análisis de esta clase de muestras, ya que, tras realizarse, se puede discriminar de manera precisa a los núcleos del fondo y de las extensiones de membrana. Sin embargo, ni siquiera a través del proceso de filtrado se pudo detectar el nucléolo de la célula o alguno de los organelos de esta, a pesar de que el perfil Z de esta clase de células ubica al nucléolo por encima del núcleo. Es relevante mencionar que al detectar las extensiones de membrana se puede realizar un análisis de la agresividad de la enfermedad y la susceptibilidad a cura del paciente.

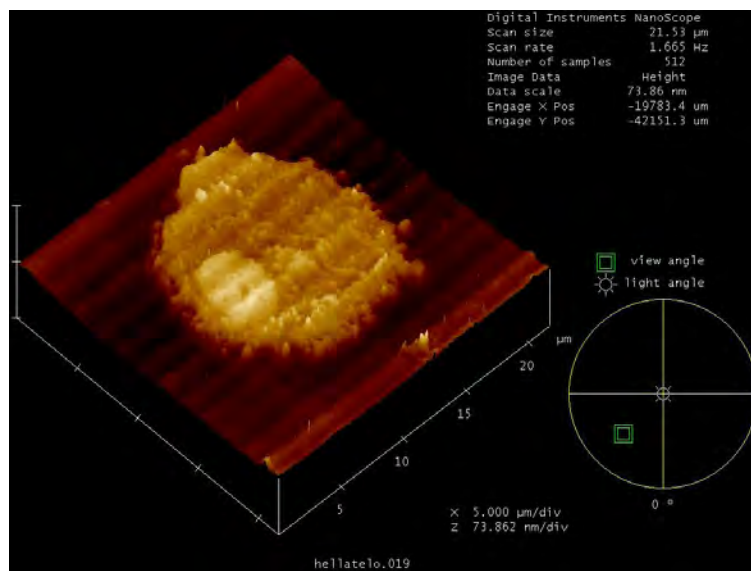
También se contó con una muestra especial de una célula HeLa rebanada con 150 nm de grosor. Curiosamente, al rebanar las células por la mitad, el núcleo, nucléolo y los organelos se logran distinguir con mayor claridad. Probablemente esto se deba a la eliminación del



ruido que generan las extensiones de membrana, así como a un fenómeno de *vaciado* que se presenta en el citoplasma de la célula.

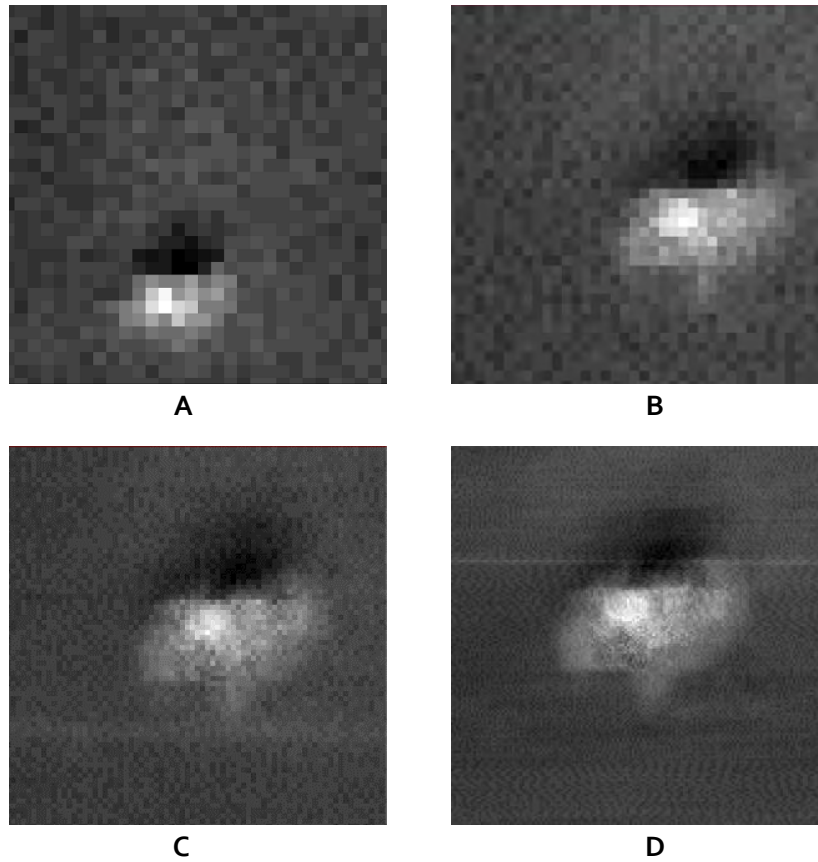


**Fig. 6.18.** Imagen cruda a 325 nm por píxel de una célula HeLa cortada por la mitad.

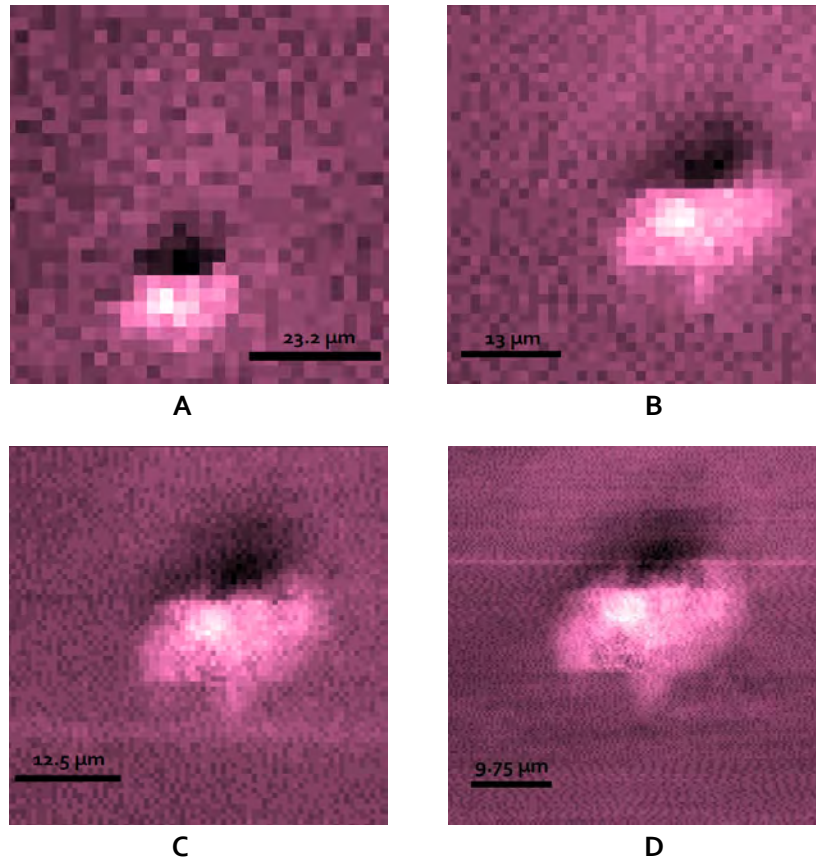


**Fig. 6.19.** Imagen de AFM de una célula HeLa cortada por la mitad [7].

Para esta variación de la célula HeLa se encontró con una primera limitante: El microscopio óptico no es capaz de verla. A su vez, es imposible obtener una imagen a través de SEM debido a que la muestra es literalmente destruida antes de poder formar una imagen.



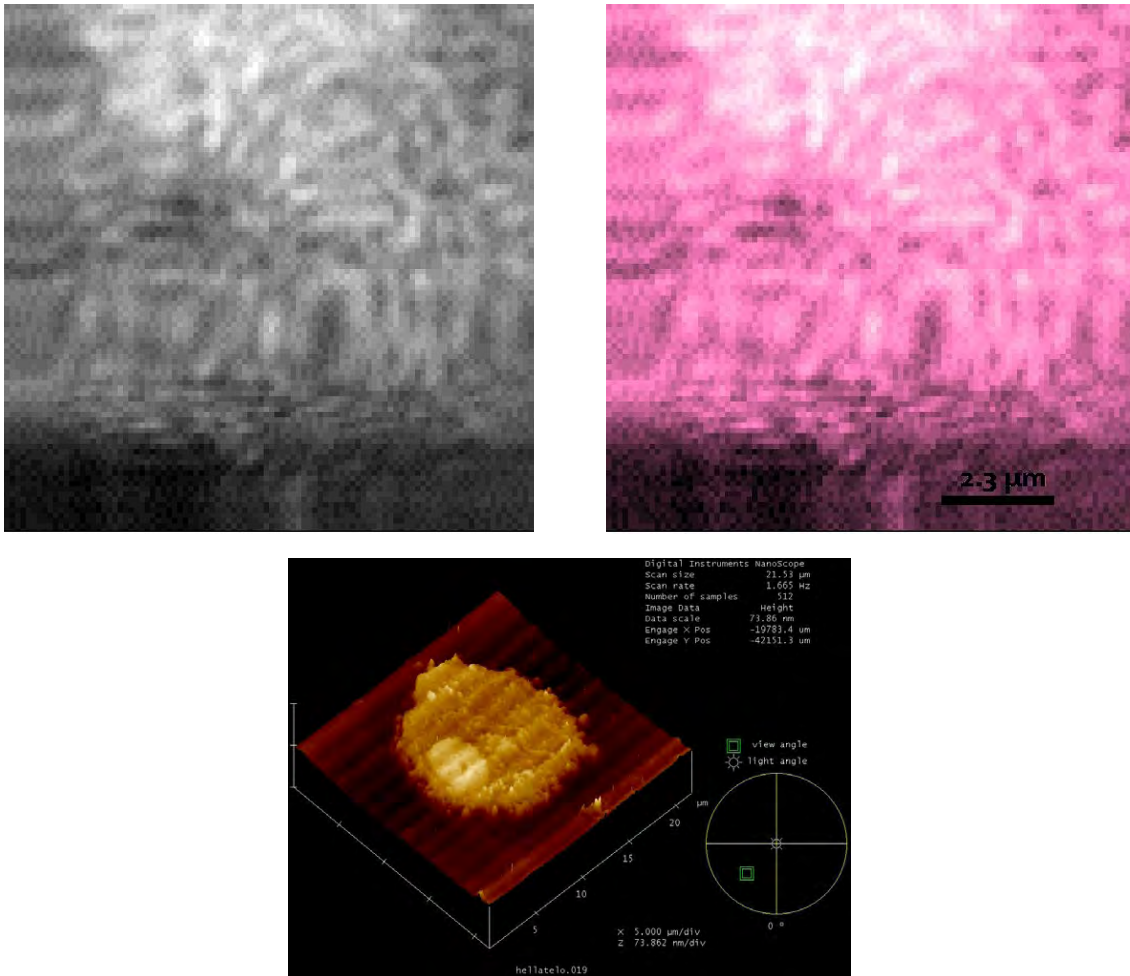
**Fig. 6.20.** Imágenes crudas de una célula HeLa rebanada a distintos factores de micropaso. **A.** Imagen cruda de una célula HeLa rebanada a 1 micropaso de  $70 \times 70 \mu\text{m}$ . **B.** Imagen cruda de una célula HeLa rebanada a 2 micropasos de  $52 \times 52 \mu\text{m}$ . **C.** Imagen cruda de una célula HeLa rebanada a 4 micropasos de  $47 \times 47 \mu\text{m}$ . **D.** Imagen cruda de una célula HeLa rebanada a 8 micropasos de  $47 \times 47 \mu\text{m}$ .



**Fig. 6.21.** Imágenes filtradas de una célula HeLa rebanada a distintos factores de micropaso.

**A.** Imagen filtrada de una célula HeLa rebanada a 1 micropaso de  $70 \times 70 \mu\text{m}$ . La célula es detectada a la perfección, a diferencia de las células completas. **B.** Imagen filtrada de una célula HeLa rebanada a 2 micropasos de  $52 \times 52 \mu\text{m}$ . El núcleo y nucléolo de la célula comienzan a distinguirse. **C.** Imagen filtrada de una célula HeLa rebanada a 4 micropasos de  $47 \times 47 \mu\text{m}$ . El citoplasma comienza a definirse al interior de la silueta de la célula. **D.** Imagen filtrada de una célula HeLa rebanada a 8 micropasos de  $47 \times 47 \mu\text{m}$ . El nucléolo se define por completo, el núcleo logra distinguirse del citoplasma y del nucléolo.

A través del barrido de esta muestra se descubrió que el Nanoscopio es capaz de detectar muestras que ni la microscopía óptica convencional, ni SEM, pueden hacer. Como un hecho inesperado, la célula deja de absorber la longitud de onda de operación, por lo que se tiene un reflejo suficiente para generar un buen contraste. Es importante destacar que, a través del filtrado espacial, el núcleo y el nucléolo de la célula se distinguen por completo, dejando ver que el resto de la célula está compuesto casi en su totalidad por citoplasma y algunas extensiones de membrana.

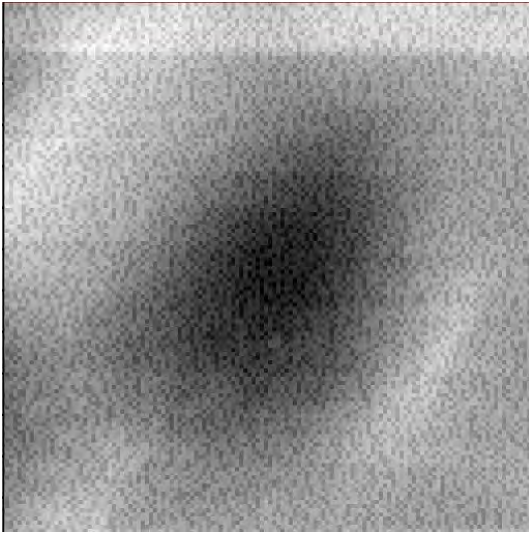


**Fig. 6.22.** Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 115 nm por pixel de 11.5 x 11.5 μm con la imagen obtenida a través de AFM [7].

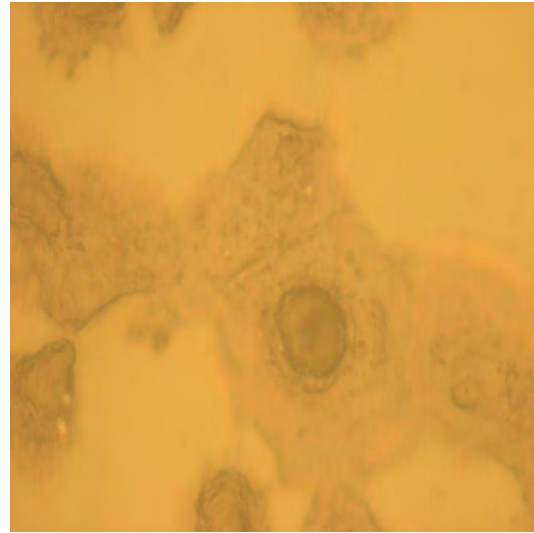
En la **Fig. 6.22** se pueden distinguir con claridad la división entre núcleo y citoplasma de la célula, de manera muy similar a lo observado en AFM. Los pequeños puntitos alrededor del nucléolo son mitocondrias asociadas a él. El hecho de que en esta preparación de la célula se tuviera una mayor reflexión resultó ser de gran ayuda para detectar el núcleo y el nucléolo. Para esta clase de muestras, el Nanoscopio es una alternativa superior a tanto técnicas convencionales como avanzadas. Sin embargo, en estas últimas imágenes, los filtros espaciales no son de gran ayuda debido a la gran cantidad de elementos de naturaleza irregular en la imagen.

### 6.1.3. Células de Cáncer de Pulmón (H1299)

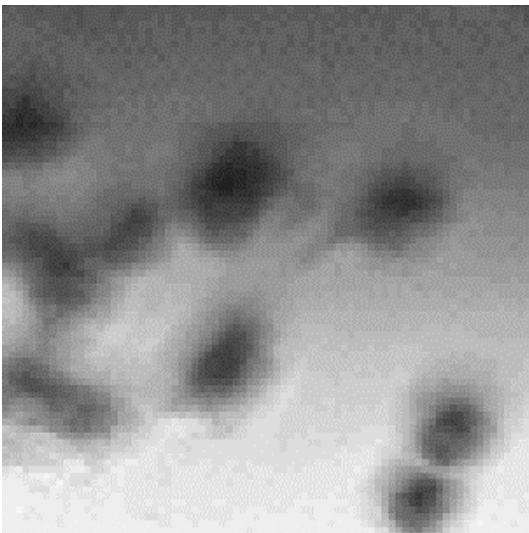
Estas células contienen granulomas neurosecretores densos – vesículas que contienen hormonas neuroendocrinas – que le dan a la clase de tumores a los que se encuentran asociados un síndrome endocrino o paraneoplástico. Debido a esto, entre el 60 y 70% de las personas con este tipo de cáncer, presentan enfermedades extensivas (las cuales no pueden ser tratadas por radiación) [9]. Esta línea celular se caracteriza por medir entre 10 y 60  $\mu\text{m}$  de diámetro [10].



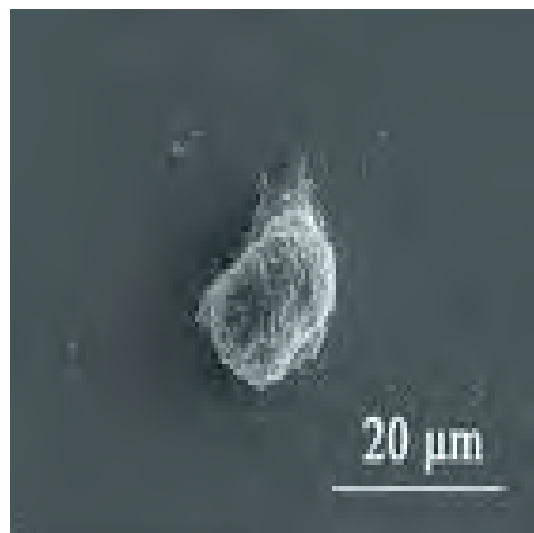
**Fig. 6.23.** Imagen cruda a 325 nm por paso de una célula H1299.



**Fig. 6.24.** Imagen óptica a 100X de un conjunto de células H1299.



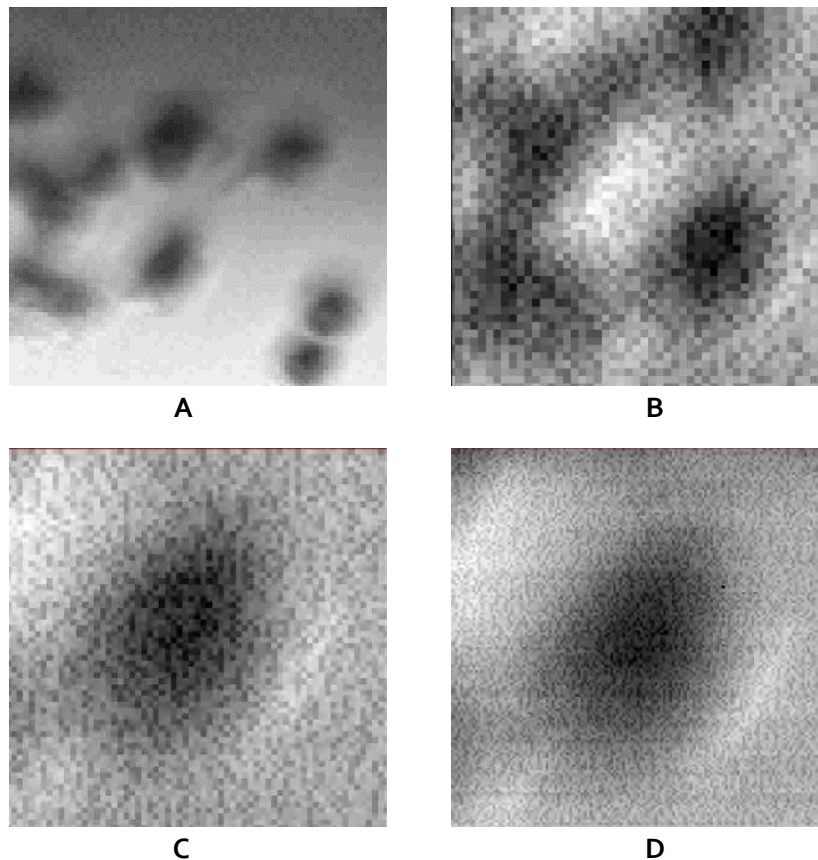
**Fig. 6.25.** Imagen cruda a 2.32  $\mu\text{m}$  por paso de un conjunto de células H1299.



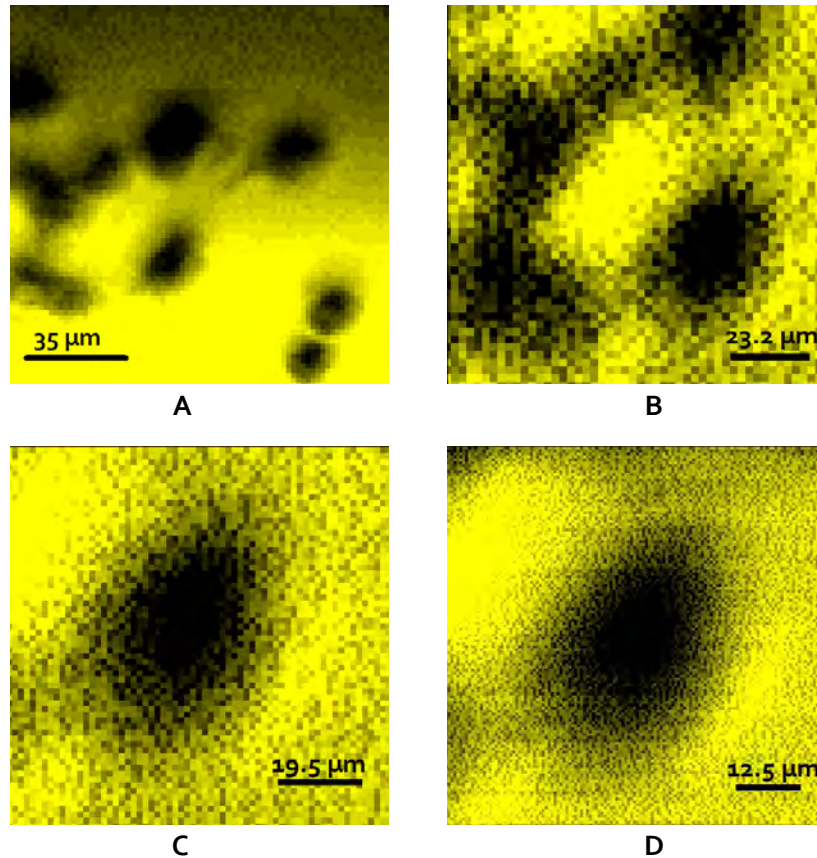
**Fig. 6.26.** Imagen SEM de una célula H1299 [11].

Al igual que con las células HeLa, la intensidad del haz incidente tuvo que ser regulada minuciosamente. Como puede apreciarse en la **Fig. 6.25**, esta muestra al estar expuesta por un periodo prolongado de tiempo a la longitud de onda de operación sufre de daño permanente. En la **Fig. 6.26**, obtenida mediante SEM, no se puede identificar el núcleo de la célula como en la **Fig. 6.24** – obtenida mediante microscopía óptica convencional – debido al recubrimiento metálico que se le debe dar a la célula para su estudio mediante esta técnica de microscopía. El reto con esta muestra era determinar si el Nanoscopio era capaz de barrer los conjuntos de células e identificar sus núcleos y nucléolos.

En esta ocasión las imágenes en color gris corresponden a las imágenes crudas, mientras que las de color amarillo corresponden a las imágenes filtradas.

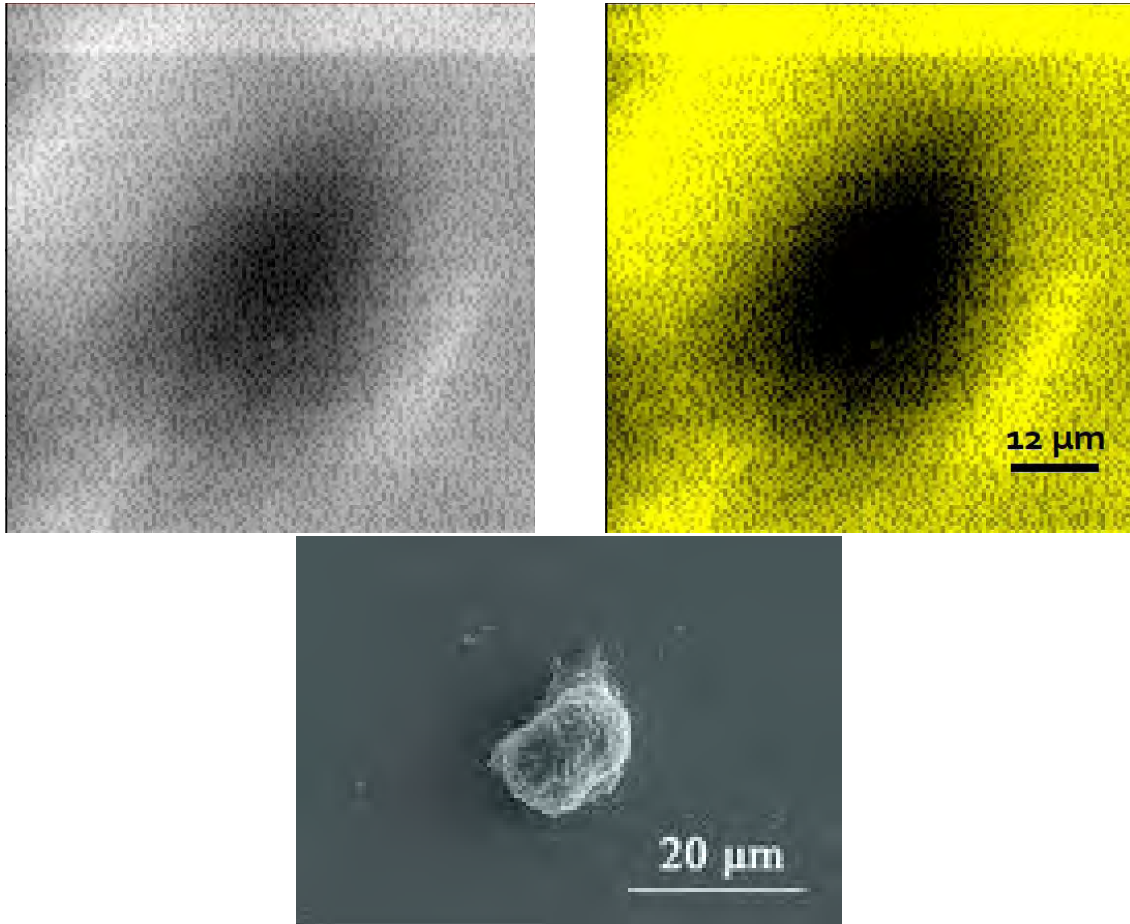


**Fig. 6.27.** Imágenes crudas de un conjunto de células H1299 a distintos factores de micropaso. **A.** Imagen cruda de un conjunto de células H1299 a 1 micropaso de 186 x 186  $\mu\text{m}$ . **B.** Imagen cruda de varias células H1299 a 1 micropaso de 116 x 116  $\mu\text{m}$ . **C.** Imagen cruda de una célula H1299 a 2 micropasos de 85 x 85  $\mu\text{m}$ . **D.** Imagen cruda de una célula H1299 a 4 micropasos de 78 x 78  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 6.28.** Imágenes filtradas de un conjunto de células H1299 a distintos factores de micropaso. **A.** Imagen filtrada de un conjunto de células H1299 a 1 micropaso de  $186 \times 186 \mu\text{m}$ . Esta muestra nuevamente invierte el contraste. El color es el fondo y la muestra es de color negro. **B.** Imagen filtrada de varias células H1299 a 1 micropaso de  $116 \times 116 \mu\text{m}$ . Las células se discriminan adecuadamente a pesar de la presencia de ruido. **C.** Imagen cruda de una célula H1299 a 2 micropasos de  $85 \times 85 \mu\text{m}$ . Acotando el análisis a una sola célula, el ruido se reduce, el núcleo y el citoplasma son distinguibles. **D.** Imagen cruda de una célula H1299 a 4 micropasos de  $78 \times 78 \mu\text{m}$ . El citoplasma se distingue, envolviendo por completo al núcleo. El nucléolo desaparece tras el proceso de filtrado.

A través del barrido de esta muestra, se puede apreciar que el diodo láser, cuando no es regulado de manera adecuada, tiene la capacidad de dañar permanentemente una muestra. Una vez más, como con las células HeLa completas, nos encontramos ante una muestra cuya absorción impide el reflejo de la luz hacia el fotodiodo para formar una imagen bien definida; debido a esto, los colores nuevamente resultaron invertidos: Color para fondo y negro para la muestra.



**Fig. 6.29.** Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 325 nm por pixel de 75 x 75  $\mu\text{m}$  con la imagen obtenida a través de SEM [11].

De esta clase de células podemos obtener un par conclusiones importantes sobre el funcionamiento del Nanoscopio y los filtros espaciales desarrollados. El primer punto es hacer notar que, sin los filtros, la imagen presenta una cantidad de ruido considerable, la cual a final de cuentas impide la formación de una imagen bien definida; esto se debe a la gran absorción de la longitud de onda de operación por parte de la muestra. El siguiente punto concierne únicamente a los filtros, ya que, gracias a ellos, el citoplasma de la célula se define al eliminar el ruido a su alrededor, asemejándose a la imagen obtenida en SEM, tanto en forma como en tamaño. Sin embargo, mediante el filtrado de las imágenes y eliminación de ruido, también se pierde un detalle importante de la imagen: la silueta de una superficie al interior de la célula. Esta superficie podría tratarse del nucléolo de la célula, sin embargo, no se puede determinar con exactitud.

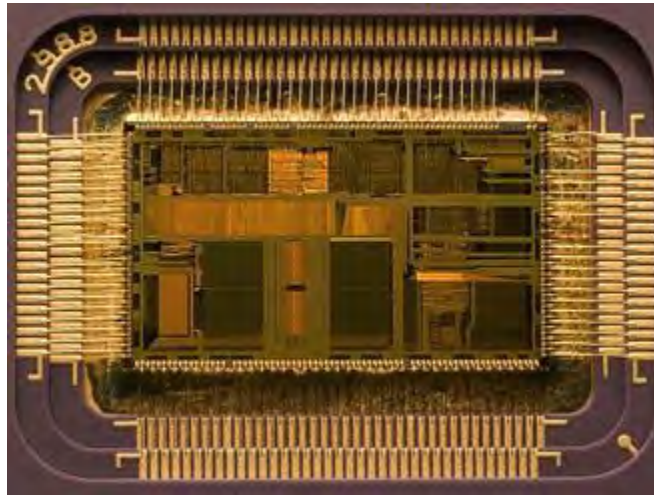


## 6.2 Muestras No Biológicas

A diferencia de las muestras biológicas, la mayoría de las muestras no biológicas presentan una gran reflexión debido a la naturaleza metálica de las mismas. Sin embargo, nuevamente hubo que regular adecuadamente la potencia de salida del diodo láser para no saturar la señal detectada por el fotodiodo.

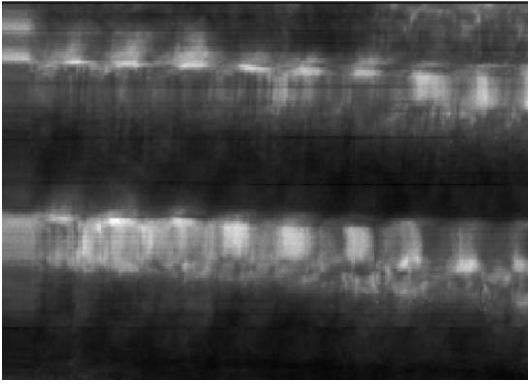
### 6.2.1 Microprocesador Intel i486 SX

Son una familia de microprocesadores de 32 bits con arquitectura x86 diseñados y fabricados por Intel Corporation. Se produjeron de 1989 hasta 1997. La longitud de sus canales MOSFET iba desde 1 micra hasta 600 nm [12]. Esta fue la última generación de microprocesadores que se integraba dentro de una placa cerámica para aislamiento térmico, dando paso a los encapsulados modernos de metal y silicio.

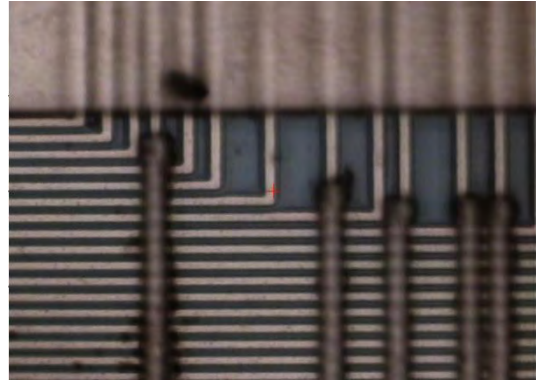


**Fig. 6.30.** Procesador Intel i486 SX dentro de la placa de conexión y aislamiento térmico.

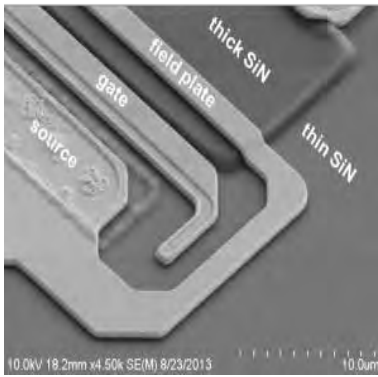
Debido a lo estorbosa que resultaba ser la placa cerámica, fue necesario remover el procesador de la placa para un análisis más sencillo. Este proceso se logró calentando la placa a 350 grados Celcius (temperatura tres veces por encima de la tolerada para su operación), derritiendo la soldadura con la que estaba sujeta a la placa.



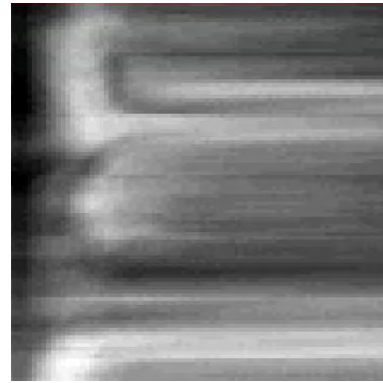
**Fig. 6.31.** Imagen cruda a 170 nm por pixel de los canales MOSFET del microprocesador.



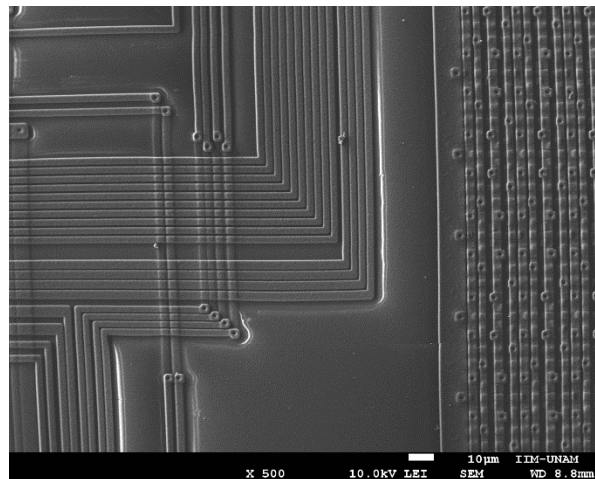
**Fig. 6.32.** Imagen óptica a 100X de los canales MOSFET de la primera y segunda capa del microprocesador.



**Fig. 6.33.** Imagen SEM de un MOSFET [13].



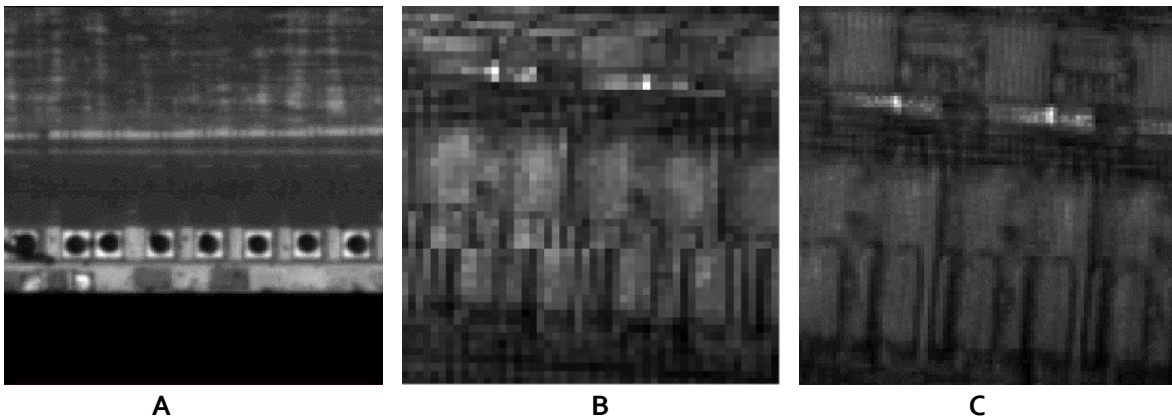
**Fig. 6.34.** Imagen cruda a 170 nm por pixel de uno de los MOSFET del microprocesador.



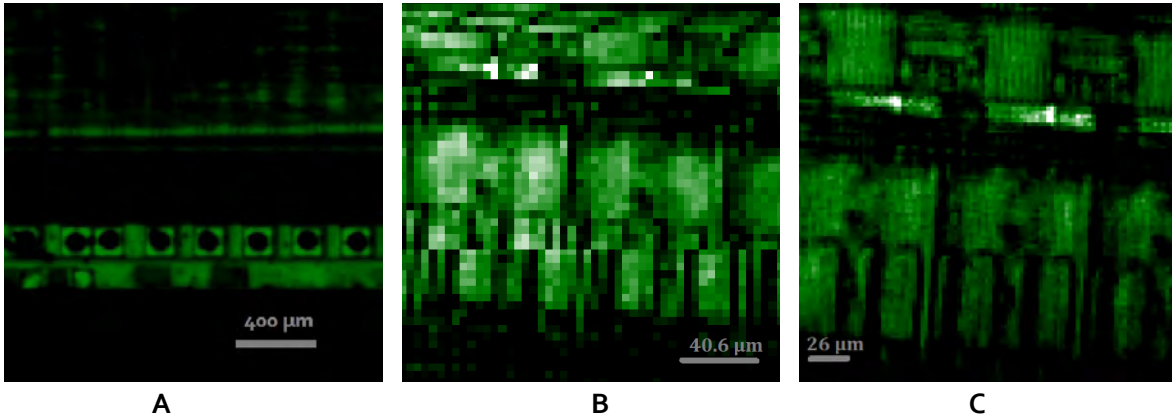
**Fig. 6.35.** Imagen SEM de los canales MOSFET del microprocesador.

Esta muestra presentó distintos desafíos para el Nanoscopio. El primero está relacionado con las **Figuras 6.32 y 6.35**: Determinar si era capaz de ver más allá de la primera o segunda capa de canales. El segundo relacionado a la película tornasol depositada en la parte superior del microprocesador, cubriendo su litografía. Esta película, al ser altamente sensible a la luz, podía agregar cantidades no deseadas de ruido a la imagen formada a partir del barrido.

Los resultados obtenidos a partir de esta muestra se presentarán en gris para las imágenes crudas y en verde para las imágenes filtradas.

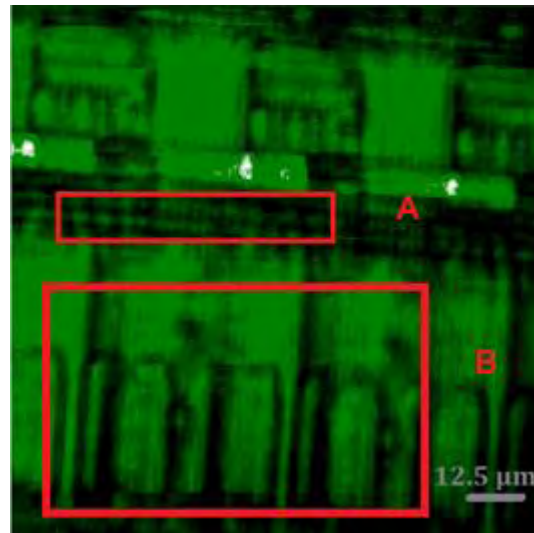


**Fig. 6.36.** Imágenes crudas de distintas zonas del microprocesador a distintos factores de micropaso. **A.** Imagen cruda de los pines de soldadura del microprocesador a 10 micras por paso de  $1.8 \times 1.8$  mm. **B.** Imagen cruda de la primera capa del microprocesador a 1 micropaso de  $130 \times 130$   $\mu\text{m}$ . **C.** Imagen cruda de la primera capa del microprocesador a 2 micropasos de  $125 \times 125$   $\mu\text{m}$ .



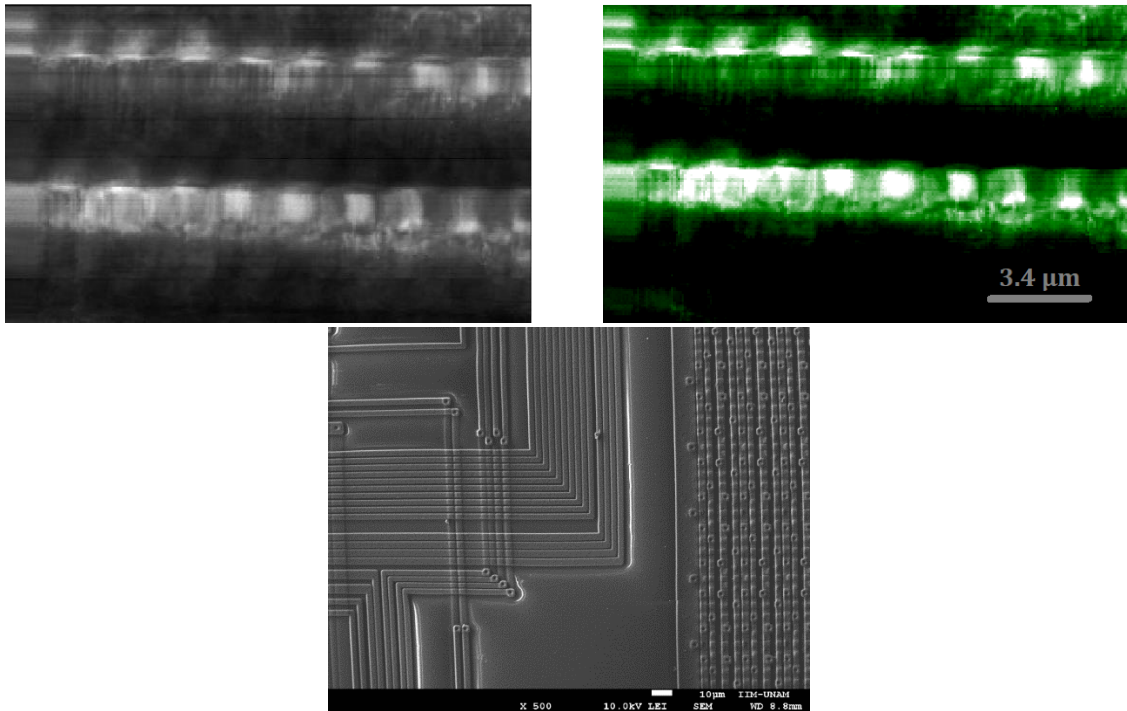
**Fig. 6.37.** Imágenes filtradas de distintas zonas del microprocesador a distintos factores de micropaso. **A.** Imagen cruda de los pines de soldadura del microprocesador a 10 micras por paso de  $1.8 \times 1.8$  mm. Las siluetas de los pines se resuelven a la perfección. **B.** Imagen cruda de la primera capa del microprocesador a 1 micropaso de  $130 \times 130$   $\mu\text{m}$ . Es difícil distinguir los elementos barridos debido a pesar del proceso de filtrado. **C.** Imagen cruda de la primera capa del microprocesador a 2 micropasos de  $125 \times 125$   $\mu\text{m}$ . Los elementos de la litografía se alcanzan a discriminar unos de otros.

Como se pensó inicialmente, la película tornasol resultó ser un problema a la hora de realizar los barridos de la muestra. Sin embargo, se pudo notar que en las zonas en las que se encontraban los pines de soldadura hacia la placa cerámica, la presencia de esta película era casi nula, permitiendo un análisis favorable de esta zona. Por el contrario, en las zonas centrales del procesador, la película era uniforme, por lo que se tuvieron que analizar de manera independiente algunas de las zonas de interés de la muestra, como se indica en la **Figura 6.38**.



**Fig. 6.38.** Zonas analizadas de manera independiente.

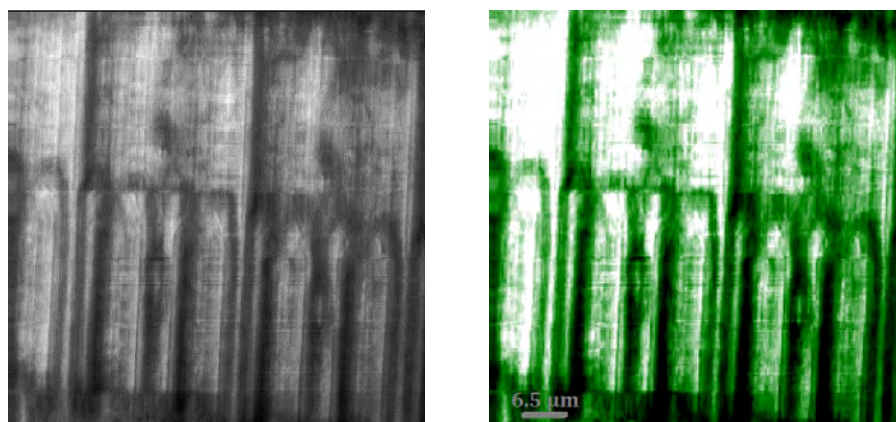
Para la Zona A:



**Fig. 6.39.** Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 170 nm por pixel de 30 x 20 μm con la imagen obtenida a través de SEM.

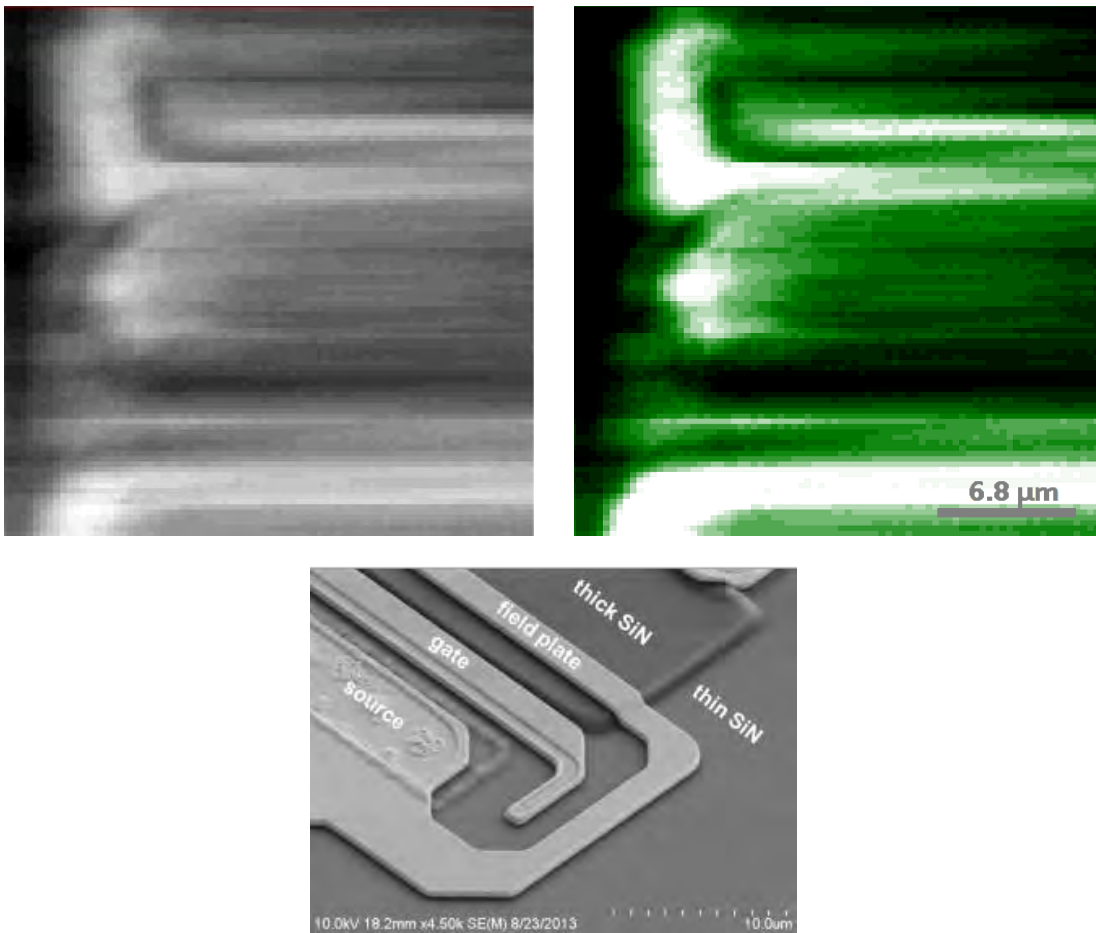
A través del barrido independiente de la zona donde se encontraban los canales de la primera capa, se obtuvo un resultado similar al obtenido mediante SEM. Como puede apreciarse en la imagen filtrada de la **Fig. 6.39**, los canales simulan un efecto tridimensional como en la imagen SEM. Gracias a los filtros espaciales se reduce considerablemente el ruido de fondo, dejando únicamente los canales de interés.

Para la Zona B:



**Fig. 6.40.** Imágenes cruda y filtrada a 325 nm por pixel de los MOSFET en la primera capa del microprocesador de 50 x 50 μm.

A pesar de haber reducido la zona de barrido, la película tornasol seguía agregando ruido a la muestra, el cual era amplificado por los filtros espaciales. Nuevamente se redujo la zona de estudio, para así tener la menor cantidad de ruido.



**Fig. 6.41.** Comparación entre la imagen cruda y filtrada a 170 nm por pixel de 17 x 17  $\mu\text{m}$  con la imagen obtenida a través de SEM [13].

De manera general, con esta muestra se determinaron nuevas limitantes y fortalezas del Nanoscopio. El dispositivo es capaz de resolver perfectamente los pines de soldadura que sujetaban al procesador con la placa cerámica. A pesar de ser de un tamaño superior al de los canales y transistores del procesador, los detalles y la irregularidad de sus circunferencias pueden ser identificados con facilidad.

Los materiales recubiertos con películas sensibles a la luz, como en este caso, a pesar de tener un enfoque adecuado, limitan mucho la resolución del Nanoscopio debido al ruido que dichas películas agregan al momento de hacer la lectura del reflejo.

Finalmente, en las **Figuras 6.39** y **6.41** se puede apreciar que el Nanoscopio permite ver con lujo de detalle las estructuras más pequeñas del procesador. Los canales de conexión de la primera capa de litografía pueden apreciarse con pequeñas irregularidades o

curvaturas a lo largo de sus superficies; mientras que los transistores pueden definirse de manera clara y precisa, casi como en un SEM.

Desafortunadamente a través del Nanoscopio no se logró enfocar las capas más profundas de la litografía. Probablemente esto se deba nuevamente a la película tornasol.

### 6.2.2 Hojuelas de Grafito

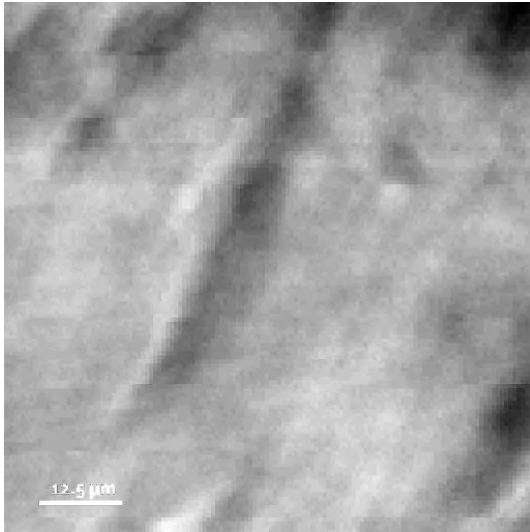
Es una de las formas alotrópicas en las que se puede presentar el carbono junto al diamante, los fullerenos, los nanotubos y el grafeno. El grafito es de color negro con brillo metálico, refractario y se exfolia con facilidad. En la dirección perpendicular a las capas presenta una conductividad baja, que aumenta con la temperatura, comportándose como un semiconductor. A lo largo de las capas la conductividad es mayor y aumenta proporcionalmente a la temperatura, comportándose como un conductor semimetálico [14].



**Fig. 6.42.** Hojuelas de grafito.

Ahora se presentarán tres muestras distintas de hojuelas de grafito: Una enfocándose en los "surcos" que se hacen a través de su superficie, otra enfocándose en las terrazas que se presentan como parte de sus multicapas, y una tercera enfocándose en la hojuela completa. A diferencia del resto de las muestras presentadas en esta tesis, las muestras relacionadas con el grafito no han sido filtradas utilizando los filtros espaciales del Capítulo 5; esto es a causa de la gran cantidad de elementos que estas muestras presentan. Estos elementos, en vez de mejorar la nitidez y contraste de la imagen, tienden a empeorarla, eliminando detalles importantes, ya que los filtros los detectan como una especie de ruido.

## Surcos

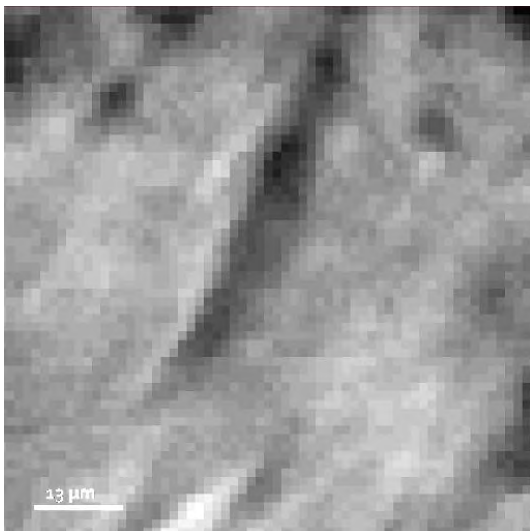


**Fig. 6.43.** Imagen a 1.25 μm por pixel de un surco en la hojuela de grafito.

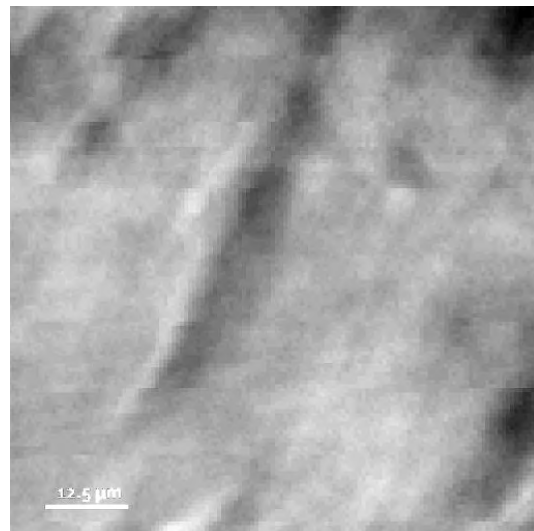


**Fig. 6.44.** Imagen SEM de hojuelas de grafito [15].

El análisis de los surcos dentro de una muestra de grafito es un punto importante para determinar si estos se originaron de manera natural o artificial. Es fundamental el no confundir una terraza con un surco. La terraza se manifiesta cuando una capa inferior o superior a la de referencia es de una longitud distinta a esta. El surco es simplemente un hueco o ralladura en la superficie de la hojuela.

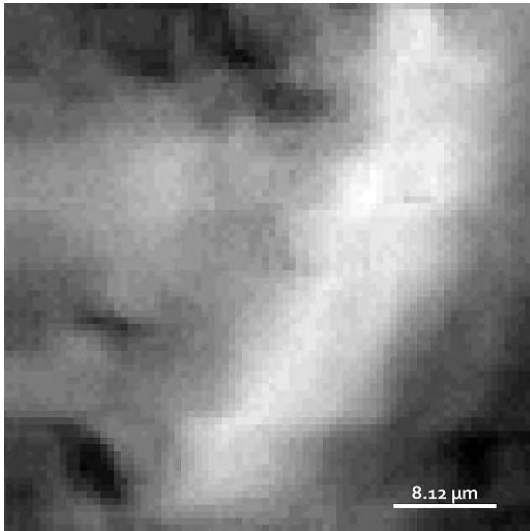


**Fig. 6.45.** Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 2.32 μm por pixel de 85 x 85 μm.

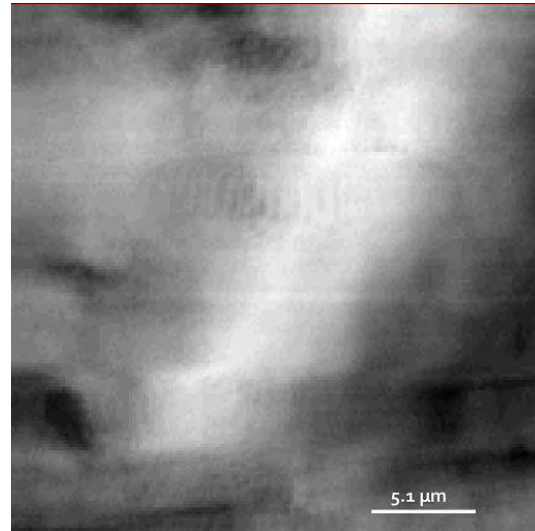


**Fig. 6.46.** Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 1.3 μm por pixel de 82 x 82 μm.

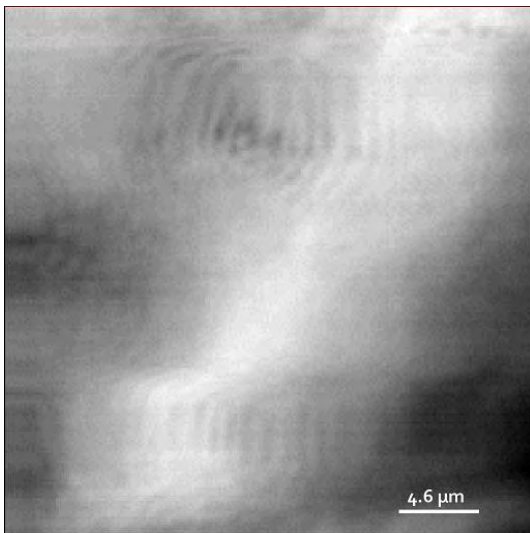




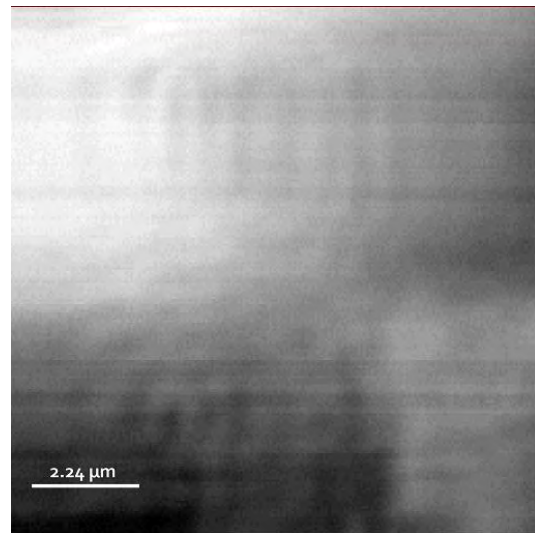
**Fig. 6.47.** Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 625 nm por pixel de 26 x 26 μm.



**Fig. 6.48.** Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 325 nm por pixel de 26 x 26 μm.



**Fig. 6.49.** Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 115 nm por pixel de 23 x 23 μm.

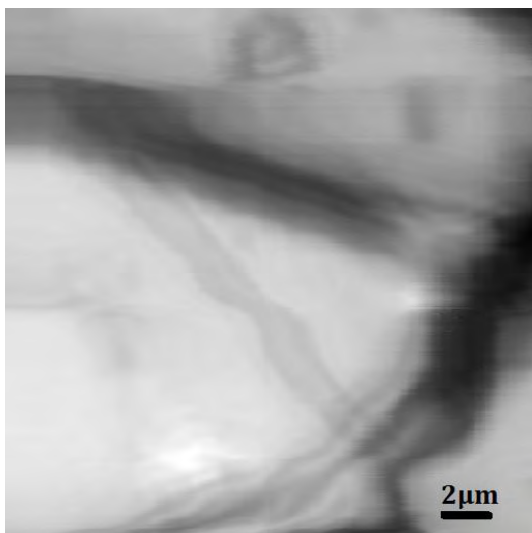


**Fig. 6.50.** Imagen de un surco en la superficie de la hojuela de grafito a 56.15 nm por pixel de 11 x 11 μm.

En la **Figura 6.46** se puede observar el surco completamente definido, siendo de aproximadamente 10 μm de ancho. A partir de la **Figura 6.47**, el enfoque se realizó directamente sobre el surco, por lo que sus alrededores, al encontrarse a una altura diferente, se consideran como fondo. En la **Figura 6.48** comienzan a hacerse notorias algunas líneas curvas alrededor de la superficie del surco. En un inicio esto se consideraba

como ruido, sin embargo, en las **Figuras 6.49 y 6.50**, cuyos pasos son menores, se siguen distinguiendo estas líneas. Este efecto podría deberse al patrón de difracción generado por la luz que ilumina el surco o por la interacción entre la superficie de la hojuela y el haz incidente.

#### *Terrazas*

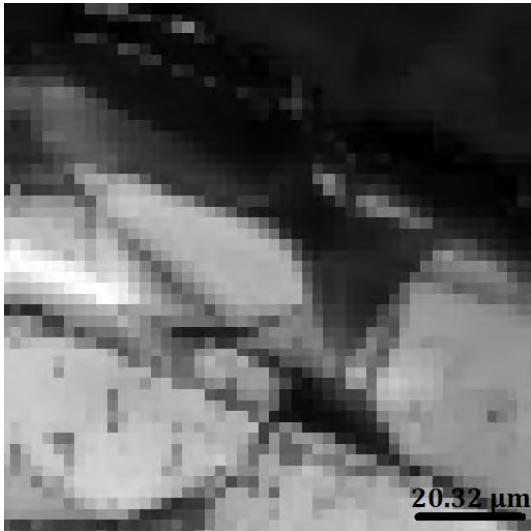


**Fig. 6.51.** Imagen de varias terrazas de la hojuela de grafito a 56.15 nm por pixel.

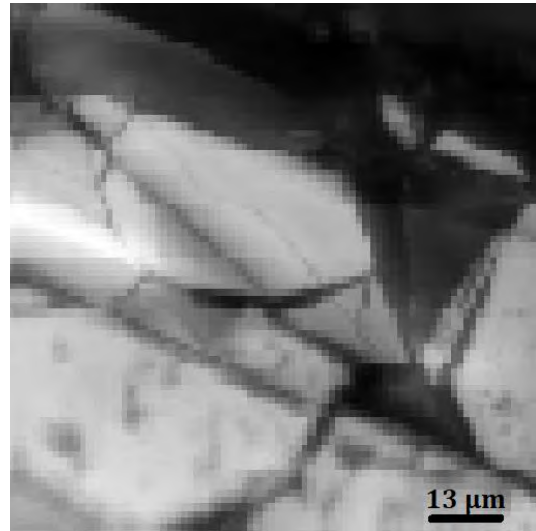


**Fig. 6.52.** Imagen SEM de hojuelas de grafito [15].

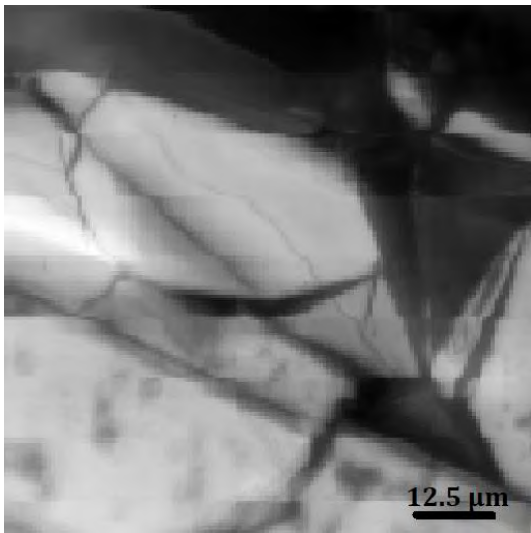
Las terrazas son una de las partes más interesantes de las hojuelas de grafito. Así como los surcos, éstas pueden tener un origen natural, por el acomodo de las capas de grafito, o uno artificial, generado por la exfoliación del material. Uno de los objetivos del Nanoscopio es el poder determinar si una muestra de grafito exfoliado ya se puede considerar Multigrafito.



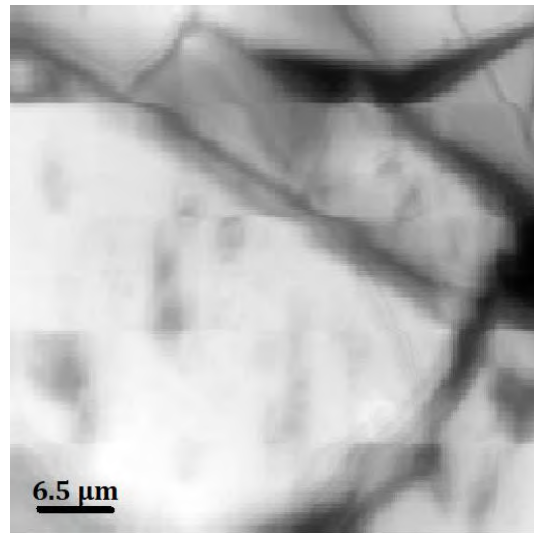
**Fig. 6.53.** Imagen de la hojuela de grafito a 2.32 μm por pixel de 116 x 116 μm.



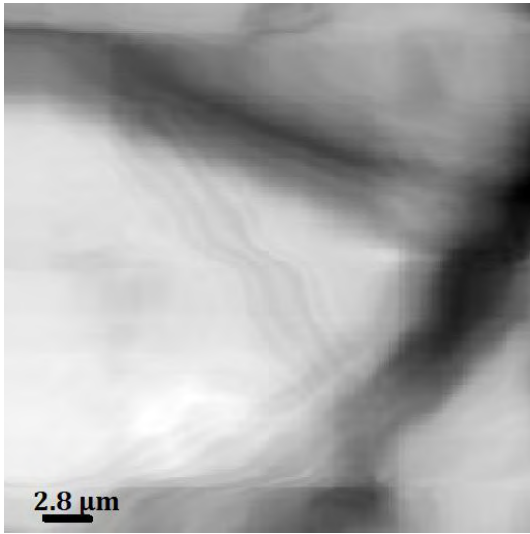
**Fig. 6.54.** Imagen de la hojuela de grafito a 1.3 μm por pixel de 104 x 104 μm.



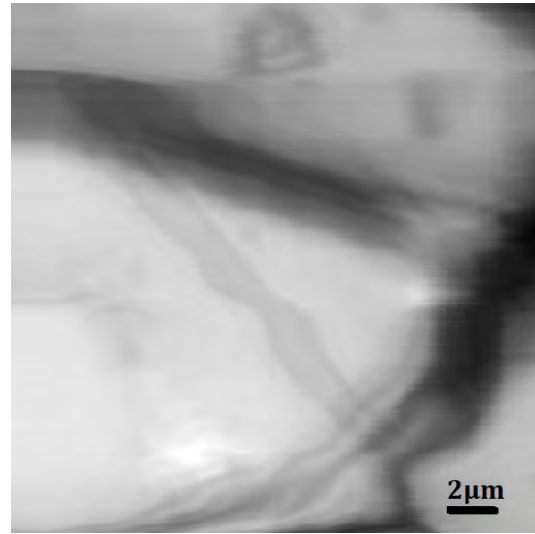
**Fig. 6.55.** Imagen de la hojuela de grafito a 625 nm por pixel de 87 x 87 μm.



**Fig. 6.56.** Imagen de las terrazas de la hojuela de grafito a 325 nm por pixel de 65 x 65 μm.



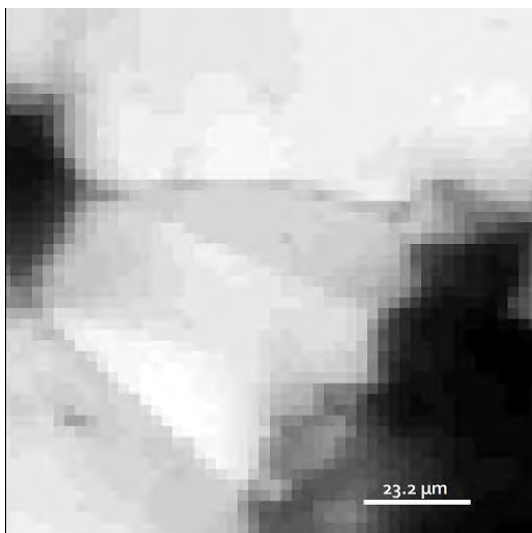
**Fig. 6.57.** Imagen de las terrazas de la hojuela de grafito a 115 nm por pixel de 34 x 34 μm.



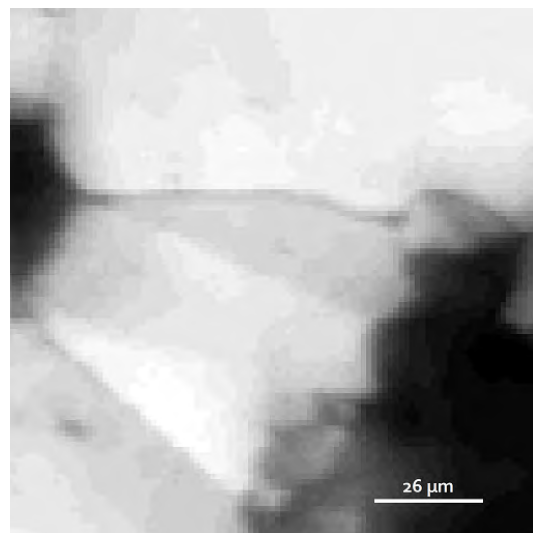
**Fig. 6.58.** Imagen de las terrazas de la hojuela de grafito a 56.15 nm por pixel de 28 x 28 μm.

Las imágenes de las hojuelas de grafito, así como de las terrazas entre sus capas, son uno de los más claros ejemplos de la capacidad que tiene el Nanoscopio. Desde la primera imagen, ver **Figura 6.53**, se comienzan a apreciar detalles sumamente pequeños y finos, completamente imperceptibles a simple vista. En la **Figura 6.56** es cuando se empiezan a notar lo que aparentemente son las terrazas de la muestra, sin embargo, en este punto aún no podría determinarse si se trata de un surco o de una terraza. En las **Figuras 6.57 y 6.58** es donde se define a la perfección tres terrazas de la hojuela. Cabe mencionar que, de comprobarse que dichas terrazas tienen un determinado grosor, podríamos decir que el dispositivo es capaz de ver Multigrafito.

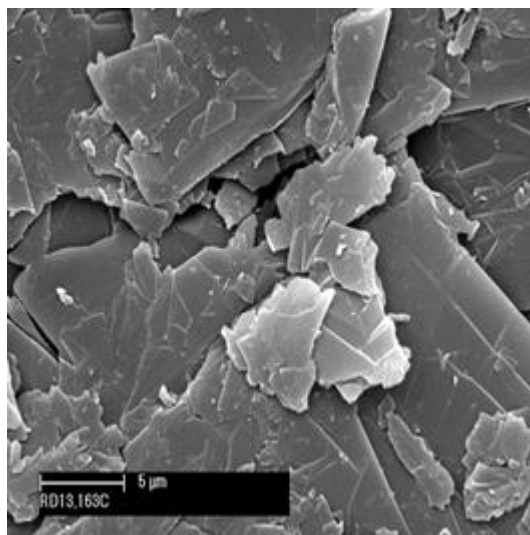
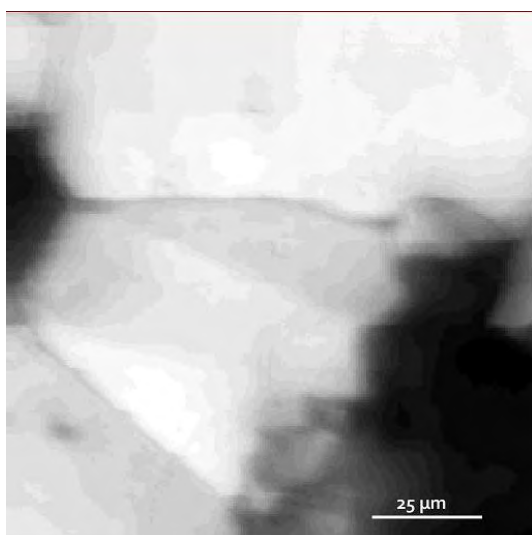
## Hojuela Completa



**Fig. 6.59.** Imagen de la hojuela de grafito a 2.32 μm por pixel de 116 x 116 μm.



**Fig. 6.60.** Imagen de la hojuela de grafito a 1.3 μm por pixel de 120 x 120 μm.



**Fig. 6.61.** Comparación entre la imagen a 625 nm por pixel de la hojuela de grafito de 125 x 125 μm con la imagen SEM de una hojuela de grafito [15].

Con el barrido sobre la hojuela completa de grafito podemos ver que, debido a las propiedades altamente reflejantes del grafito, no importa cuánto se modifique el paso del motor, los detalles, tanto grandes, como pequeños, pueden definirse con finura.

Las imágenes obtenidas del grafito son la mejor prueba de la capacidad del Nanoscopio. Mientras el tamaño del paso se va haciendo más pequeño, la definición en las imágenes se

vuelve sumamente detallada, de tal manera que las imágenes obtenidas se asemejan a las obtenidas a través de SEM.

Como puede apreciarse a lo largo de los resultados obtenidos, el Nanoscopio Óptico de Barrido por Luz (NOBL) es una herramienta poderosa, capaz de reconstruir imágenes a nanoescala. Las imágenes obtenidas a través de su operación, tras un proceso de filtrado y mejoramiento, llegan a compararse en algunos casos con las imágenes obtenidas a través de métodos más refinados y costosos.

Los filtros espaciales desarrollados resultaron ser una parte fundamental del dispositivo, complementando y potenciando su funcionamiento.

### *Referencias del capítulo:*

[1] E. Aguilar-Mendoza. Integración de la señal óptica para obtener imágenes de nanotecnología. Tesis de Licenciatura. UNAM. 2017. Capítulo 4.

[2] USAF 1951 Chart (Standard Layout). Applied Image Inc. Hoja de datos. (2004)

[3] J. J. Giacomini. Medicinal value of sunflower pollen against bee pathogens. *Scientific Reports*. **8** (2018)

[4] M. P. Mačukanović-Jocić. Pollen morphology of the Balkan-Carpathian endemic *Campanula lingulata* Waldst. & Kit. (Campanulaceae). *Matica Srpska J. Nat. Sci. Novi Sad*. **130** 75-82. (2016)

[5] D. W. Batts. Cancer cells killed Henrietta Lacks – then made her immortal. *The Virgin Pilot*. **1** 12-14. (2010)

[6] T. Briiuner. Tumor Cell Invasion and Gap Junctional Communication. *Invasion Metastasis*. **10** 31-34. (1990)

[7] D. Pineda-Vázquez. Estudio de la nucleogénesis con el Microscopio de Fuerza Atómica. Tesis de Doctorado. UNAM. En desarrollo.

[8] CJ. Capua. Cytotoxicity of *Atriplex confertifolia*. *J. Toxicol*. **2010** 966548. (2010)

[9] G. Rosti. Small cell lung cancer. *Annals of Oncology*. **17** 5-10. (2006)

[10] RM. Phelps. NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line supplement. *J. Cell. Biochem. Suppl*. **24** 1–291. (1996)

[11] C. Ruobing. Marine Bacterial Polysaccharide EPS11 Inhibits Cancer Cell Growth via Blocking Cell Adhesion and Stimulating Anoikis. *Marine Drugs*. **16** 85. (2018)

[12] EMBEDDED Intel486™ SX PROCESSOR. Intel Corporation. Hoja de datos. (1997)

- [13] D. Sacchetto. Design Aspects of Carry Lookahead Adders with Vertically-Stacked Nanowire Transistors. Proceedings of the IEEE International Symposium on Circuits and Systems. (ISCAS 2010). **1** 1715-1717. (2010)
- [14] J. Anthony. Handbook of Mineralogy. Mineralogical Society of America. E. U. A. (1990)
- [15] Asbury Carbons. <https://asbury.com/technical-presentations-papers/materials-in-depth/vein-graphite/> (2018)

## Conclusiones

A través del desarrollo de esta tesis se demostró el principio básico de funcionamiento del Nanoscopio Óptico de Barrido por Luz (NOBL), así como las mejoras mecánicas, electrónicas y de software desarrolladas para su mejoramiento. El Nanoscopio presentado tiene un desplazamiento mecánico experimental en X y Y de aproximadamente 56.15 nm, combinada con los 197.64 nm de resolución óptica. Además, se presentaron resultados de muestras de distinta naturaleza y con propiedades ópticas diversas.

Es importante recalcar que las gradientes topológicas de la muestra barrida son aquellas que generan una reflexión suficiente para que el Nanoscopio logre reconstruir una imagen. Sin embargo, para tener una imagen detallada, con buen contraste y bien definida, es importante que tenga un porcentaje de absorción en dicho gradiente. De manera empírica, se recomienda tener una reflexión – o absorción, según sea el caso – de entre 30 y 70% para obtener los mejores resultados posibles con el dispositivo.

De manera individual, utilizando los resultados presentados en el capítulo anterior, se pueden concluir los siguientes puntos:

- Para el Polen: El Nanoscopio es capaz de discriminar a la perfección un grano de otro cuando se barre una zona en la que varios granos se encuentran juntos. Cuando se llega a la menor escala de desplazamiento, los detalles más finos, como la exina, comienzan a notarse.
- Para las células HeLa: Se pudieron visualizar las extensiones de membrana, fundamentales para el diagnóstico de un paciente. Para las células completas, el Nanoscopio no fue capaz de visualizar al interior de la célula; sin embargo, en el caso de la muestra rebanada, se pudieron visualizar el citoplasma, núcleo y nucléolo.
- Para las células H1299: El citoplasma de la célula puede ser definido a la perfección, así como su núcleo. A través de las imágenes crudas se puede detectar lo que aparentemente es el nucléolo, pero éste desaparece tras realizar el proceso de filtrado.
- Para el microprocesador: El dispositivo es capaz de resolver perfectamente los pines de soldadura; a pesar de ser de un tamaño superior al de los canales y transistores del procesador, los detalles y la irregularidad de sus circunferencias pueden ser identificados con facilidad.

Los materiales recubiertos con películas sensibles a la luz, como en este caso, a pesar de tener un enfoque adecuado, limitan mucho el contraste del Nanoscopio debido al ruido que dichas películas agregan al momento de hacer la lectura del reflejo. Asimismo, el Nanoscopio permite ver en detalle las estructuras más pequeñas del procesador. Los canales de conexión de la primera capa de litografía pueden apreciarse con pequeñas irregularidades o curvaturas a lo largo de sus



superficies; mientras que los transistores pueden resolverse de manera clara y precisa.

Desafortunadamente a través del Nanoscopio no se logró enfocar las capas más profundas de la litografía.

- Para las hojuelas de grafito: Gracias a la alta reflexión de las hojuelas, las imágenes que se obtienen mediante el Nanoscopio tienen una resolución impecable, sin la necesidad de realizar un procesamiento mediante filtros espaciales. Ya sean surcos, terrazas u hojuelas completas, el desempeño del Nanoscopio es el óptimo. Permite detectar zonas con Multigrafeno, muy útiles al momento de seleccionar la muestra.

Finalmente, es importante mencionar que este dispositivo sigue estando condicionado ópticamente por el límite de difracción, sólo que, gracias a la combinación de la resolución óptica de sus componentes y el desplazamiento mecánico experimental de los motores de pasos, se obtiene una imagen reconstruida con gran detalle. El software juega un papel fundamental en la reconstrucción de estas imágenes, no sólo en la adquisición de los datos eléctricos provenientes del fotodiodo, sino también en el filtrado de estas.

## Trabajo a futuro

El Nanoscopio es un dispositivo con mucho potencial de escalabilidad, por lo que, en cuanto a trabajo a futuro, se podrían considerar las siguientes sugerencias:

- ✓ Mejorar los componentes mecánicos del sistema. Se requieren componentes de muy alta precisión espacial, por lo que el uso de motores piezoeléctricos podría ser una opción ideal. Asimismo, estos motores deberán contar con un torque capaz de desplazar el sistema de platinas de manera adecuada. En cuanto a las platinas, es posible que la resolución de los motores pueda mejorar un poco acoplándolos a platinas con resortes suaves.
- ✓ Implementar un acoplamiento a través de fibra óptica para tener distintas longitudes de onda disponibles para barrer las muestras. De esta manera, las muestras sensibles a los 405 nm podrían ser analizadas con longitudes de onda mayores.
- ✓ Utilizar un objetivo de alta reflexión y de apertura numérica mayor.
- ✓ Implementar más y mejores filtros espaciales, capaces de mejorar aún más la nitidez y el contraste de las imágenes.
- ✓ Acoplar una cámara para la inmediata localización de la zona de interés de una muestra.
- ✓ Diseñar un sistema de enfoque automático, similar al de las cámaras digitales, para así tener siempre la certeza de que el haz está siendo reflejado óptimamente en el fotodiodo.
- ✓ Agregar un eje  $\theta$  adicional a los X, Y, Z. De esta manera, las muestras también pueden ser barridas de forma diagonal.

# Apéndices

## Apéndice A: Hojas de Datos

DL-5146-101S

# BLUE - VIOLET LASER DIODE DL-5146-101S

**SANYO**

Ver.3 April, 2009

### Features

- Wavelength : 405nm(Typ.)
- Output power : 40mW
- Threshold current : I<sub>th</sub>=35mA(Typ.)
- Package :  $\phi$ 5.6mm with PD

### Applications

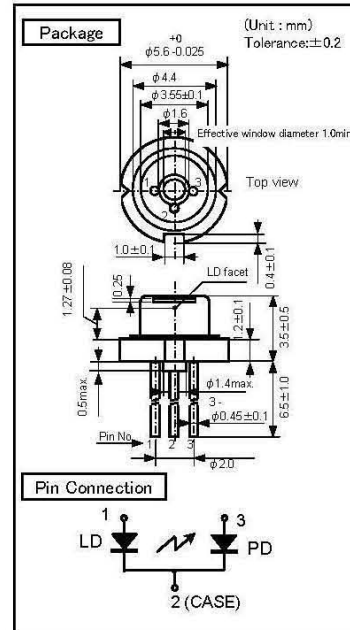
- Laser module
- Industrial Use

### Absolute Maximum Ratings

(T<sub>c</sub>=25°C)

Parameter	Symbol	Ratings	Unit
Light Output	Po(CW)	45	mW
Reverse Voltage (LD)	VR	2	V
Operating Temperature <sup>1)</sup>	Topr	0 to +75	°C
Storage Temperature <sup>1)</sup>	Tstg	-40 to +85	°C

1) Case temperature.



### Electrical and Optical Characteristics <sup>2) 3) 4) 5)</sup>

(T<sub>c</sub>=25°C)

Parameter	Symbol	Condition	Min.	Typ.	Max.	Unit	
Threshold Current	I <sub>th</sub>	CW	-	35	55	mA	
Operating Current	I <sub>op</sub>	Po=40mW	-	70	100	mA	
Operating Voltage	V <sub>op</sub>	Po=40mW	-	5.2	5.7	V	
Lasing Wavelength	Lp	Po=40mW	395	405	415	nm	
Beam <sup>6)</sup> Divergence	Perpendicular	Qv	Po=40mW	16	19	23	°
	Parallel	Qh	Po=40mW	6	8	12	°
Off Axis Angle	Perpendicular	dQv	Po=40mW	-3	-	3	°
	Parallel	dQh	Po=40mW	-3	-	3	°
Differential Efficiency	SE	Po=40mW	0.8	1.2	-	mW/mA	
Monitoring Output Current	I <sub>m</sub>	Po=40mW	0.1	0.3	1.0	mA	

2) Initial Values. 3) All the above values are evaluated with sanyo's measuring apparatus.

4) It makes a typical value a Reference Value. 5) Measurement condition : CW. 6) Full angle at half maximum.

**Note :** The above product specification are subject to change without notice.

**SANYO Electric Co.,Ltd.**

Electronic Device Company

New Products Division of Photonics Management Department

URL <http://www.edc.sanyo.com>

### ◆CONTACT

Electronic Device Company Sales & Marketing Division  
1-1-10 Ueno, Taifu-ku, Tokyo, 110-8534 JAPAN  
Tel: +81-3-3837-6272 Fax: +81-3-3837-6390

## Objetivo Nikon 100x

# 100X Nikon Achromatic Finite Conjugate Objective



Stock No. #59-938

**8230.00**

1 - 5 for \$230.00 each.

6 or more for \$205.00.

## Specifications

Type	Achromatic, Spring Loaded Head
Magnification	100X
Numerical Aperture NA	1.25
Working Distance (mm)	0.14
Effective Focal Length EFL (mm)	0.14
Resolving Power ( $\mu\text{m}$ )	0.2
Depth of Focus ( $\mu\text{m}$ )	0.2
Field of View (mm)	0.18
Mounting Threads	RMS
Manufacturer	Nikon
Rolls	N



OPT301

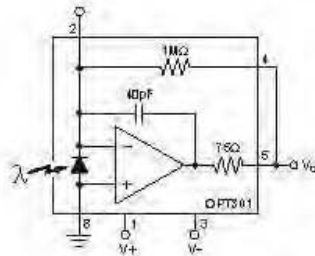
## INTEGRATED PHOTODIODE AND AMPLIFIER

### FEATURES

- ◆ PHOTODIODE SIZE: 0.090 × 0.090 inch (2.29 × 2.29mm)
- ◆ 1MΩ FEEDBACK RESISTOR
- ◆ HIGH RESPONSIVITY: 0.47A/W(650nm)
- ◆ IMPROVED UV RESPONSE
- ◆ LOW DARK ERRORS: 2mV
- ◆ BANDWIDTH: 4kHz
- ◆ WIDE SUPPLY RANGE: ±2.25 to ±18V
- ◆ LOW QUIESCENT CURRENT: 400μA
- ◆ HERMETIC TO-99

### APPLICATIONS

- ◆ MEDICAL INSTRUMENTATION
- ◆ LABORATORY INSTRUMENTATION
- ◆ POSITION AND PROXIMITY SENSORS
- ◆ PHOTOGRAPHIC ANALYZERS
- ◆ SMOKE DETECTORS

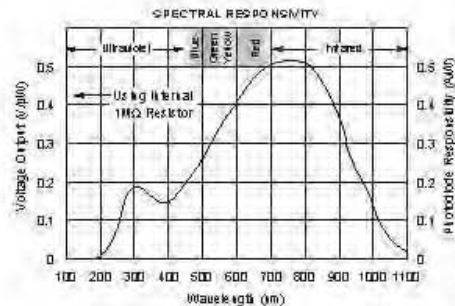


### DESCRIPTION

The OPT301 is an opto-electronic integrated circuit containing a photodiode and transimpedance amplifier on a single dielectrically isolated chip. The transimpedance amplifier consists of a precision FET-input op amp and an on-chip metal film resistor. The 0.09 × 0.09 inch photodiode is operated at zero bias for excellent linearity and low dark current.

The integrated combination of photodiode and transimpedance amplifier on a single chip eliminates the problems commonly encountered in discrete designs such as leakage current errors, noise pick-up and gain peaking due to stray capacitance.

The OPT301 operates over a wide supply range (±2.25 to ±18V) and supply current is only 400μA. It is packaged in a hermetic TO-99 metal package with a glass window, and is specified for the -40°C to 85°C temperature range.



International Airprox Industrial Park • Milling Address: PO Box 11440, Tucson, AZ 85724 • Street Address: 6701 S. Tucson Blvd, Tucson, AZ 85714 • Tel: (520) 744-1111 • Fax: (520) 744-1111  
 Internet: <http://www.surr-brown.com/> • E-Mail: [sb@www.surr-brown.com](mailto:sb@www.surr-brown.com) • FAX Line: (520) 544-4122 (Outside the U.S. Only) • C.O. # 8-BROCORP • Telex: 800-4431 • FAX: (520) 744-1511 • Immediate Products: (520) 544-4122

## SPECIFICATIONS

### ELECTRICAL

At  $T_a = +25^\circ\text{C}$ ,  $V_s = \pm 15\text{V}$ ,  $\lambda = 650\text{nm}$ , Internal  $1\text{M}\Omega$  feedback resistor, unless otherwise noted.

PARAMETER	CONDITIONS	OPT301M			UNITS
		MIN	TYP	MAX	
<b>RESPONSIVITY</b>					
Photodiode Current	650nm		0.47		A/W
Voltage Output	650nm		0.47		V <sub>A</sub> /W
vs Temperature			200		ppm/°C
Unit-to-Unit Variation	650nm		±5		%
Nonlinearity <sup>(1)</sup>	FS Output = 10V (0.090 x 0.090in)		0.01		% of FS
Photodiode Area	(2.29 x 2.29mm)		0.008		in <sup>2</sup>
			5.2		mm <sup>2</sup>
<b>DARK ERRORS, RTO<sup>(2)</sup></b>					
Offset Voltage, Output			±0.5	±2	mV
vs Temperature			±10		µV/°C
vs Power Supply	$V_s = \pm 2.25\text{V to } \pm 18\text{V}$		10	100	µV/V
Voltage Noise	Measured BW = 0.1 to 100kHz		160		µVrms
<b>RESISTOR—1MΩ Internal</b>					
Resistance			1		MΩ
Tolerance			±0.5	±2	%
vs Temperature			50		ppm/°C
<b>FREQUENCY RESPONSE</b>					
Bandwidth, Large or Small-Signal, -3dB			4		kHz
Rise Time, 10% to 90%			90		µs
Settling Time, 1%	FS to Dark		240		µs
0.1%	FS to Dark		350		µs
0.01%	FS to Dark		900		µs
Overload Recovery Time	100% overdrive, $V_s = \pm 15\text{V}$		240		µs
	100% overdrive, $V_s = \pm 5\text{V}$		500		µs
	100% overdrive, $V_s = \pm 2.25\text{V}$		1000		µs
<b>OUTPUT</b>					
Voltage Output	$R_L = 10\text{k}\Omega$ $R_L = 5\text{k}\Omega$	(V+) - 1.25 (V+) - 2	(V+) - 0.65 (V+) - 1		V V
Capacitive Load, Stable Operation			10		nF
Short-Circuit Current			±18		mA
<b>POWER SUPPLY</b>					
Specified Operating Voltage			±15		V
Operating Voltage Range		±2.25		±18	V
Quiescent Current	$I_D = 0$		±0.4	±0.5	mA
<b>TEMPERATURE RANGE</b>					
Specification		-40		+85	°C
Operating/Storage		-65		+125	°C
Thermal Resistance, $\theta_{JA}$			200		°C/W

NOTES: (1) Deviation in percent of full scale from best-fit straight line. (2) Referred to Output. Includes all error sources.

### PHOTODIODE SPECIFICATIONS

At  $T_a = +25^\circ\text{C}$ , unless otherwise noted.

PARAMETER	CONDITIONS	Photodiode of OPT301			UNITS
		MIN	TYP	MAX	
Photodiode Area	(0.090 x 0.090in) (2.29 x 2.29mm)		0.008		in <sup>2</sup>
Current Responsivity	650nm		5.1		mm <sup>2</sup>
Dark Current	$V_D = 0\text{V}^{(1)}$		0.47		A/W
vs Temperature			500		fA
Capacitance	$V_D = 0\text{V}^{(1)}$		doubles every 10°C 4000		pF

NOTE: (1) Voltage Across Photodiode.

## SPECIFICATIONS (CONT)

### ELECTRICAL

### Op Amp Section of OPT301<sup>(1)</sup>

At  $T_a = +25^\circ\text{C}$ ,  $V_E = \pm 15\text{V}$ , unless otherwise noted.

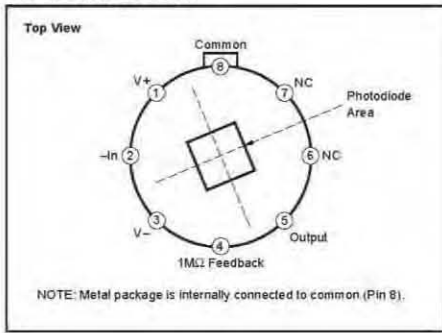
PARAMETER	CONDITIONS	OPT301 Op Amp			UNITS
		MIN	TYP	MAX	
<b>INPUT</b> Offset Voltage vs Temperature vs Power Supply Input Bias Current vs Temperature	$V_E = \pm 2.25\text{V to } \pm 18\text{V}$		±0.5 .5 10 1 doubles every 10°C		mV µV/°C µV/V pA
<b>NOISE</b> Input Voltage Noise Voltage Noise Density, f=10Hz f=100Hz f=1kHz Current Noise Density, f=1kHz			30 25 15 0.8		nV/√Hz nV/√Hz nV/√Hz fA/√Hz
<b>INPUT VOLTAGE RANGE</b> Common-Mode Input Range Common-Mode Rejection			±14.4 106		V dB
<b>INPUT IMPEDANCE</b> Differential Common-Mode			$10^{12} \parallel 3$ $10^{12} \parallel 3$		Ω  pF Ω  pF
<b>OPEN-LOOP GAIN</b> Open-Loop Voltage Gain			120		dB
<b>FREQUENCY RESPONSE</b> Gain-Bandwidth Product Slew Rate Settling Time 0.1% 0.01%			380 0.5 4 5		KHz V/µs µs µs
<b>OUTPUT</b> Voltage Output Short-Circuit Current	$R_L = 10\text{k}\Omega$ $R_L = 5\text{k}\Omega$	(V+) - 1.25 (V+) - 2	(V+) - 0.65 (V+) - 1 ±18		V V mA
<b>POWER SUPPLY</b> Specified Operating Voltage Operating Voltage Range Quiescent Current	$I_O = 0$	±2.25	±15 ±0.4	±18 ±0.5	V V mA

6

NOTE: (1) Op amp specifications provided for information and comparison only.

The information provided herein is believed to be reliable; however, BURR-BROWN assumes no responsibility for inaccuracies or omissions. BURR-BROWN assumes no responsibility for the use of this information, and all use of such information shall be entirely at the user's own risk. Prices and specifications are subject to change without notice. No patent rights or licenses to any of the circuits described herein are implied or granted to any third party. BURR-BROWN does not authorize or warrant any BURR-BROWN product for use in life support devices and/or systems.

**PIN CONFIGURATION**



**ABSOLUTE MAXIMUM RATINGS**

Supply Voltage	±18V
Input Voltage Range (Common Pin)	±V <sub>S</sub>
Output Short-Circuit (to ground)	Continuous
Operating Temperature	-55°C to +125°C
Storage Temperature	-55°C to +125°C
Junction Temperature	+125°C
Lead Temperature (soldering, 10s)	+300°C



**ELECTROSTATIC DISCHARGE SENSITIVITY**

This integrated circuit can be damaged by ESD. Burr-Brown recommends that all integrated circuits be handled with appropriate precautions. Failure to observe proper handling and installation procedures can cause damage.

ESD damage can range from subtle performance degradation to complete device failure. Precision integrated circuits may be more susceptible to damage because very small parametric changes could cause the device not to meet its published specifications.

**PACKAGE INFORMATION**

PRODUCT	PACKAGE	PACKAGE DRAWING NUMBER <sup>(1)</sup>
OPT301M	8-Pin TO-99	001-1

NOTE: (1) For detailed drawing and dimension table, please see end of data sheet, or Appendix C of Burr-Brown IC Data Book.



---

## Chapter 5 Specification

### 5.1 Specification

#### Stage Specifications

Parameter	Value
Travel	13 mm
Travel Mechanism	Crossed Roller Bearings
Deck Height	62.5 mm (2.46")
Optical Axis Height	75 mm (2.95")
Max Load Capacity	4.4 kg (9.7 lbs)
Mounting Barrel	Ø 9.5 mm (Ø 0.38")
Pitch and Yaw	X: ±125 µrad Y: ±75 µrad Z: ±150 µrad
Straightness	± 10 µm

#### Drive Specifications

Parameter	Value
Travel Range	Coarse: 13mm (1/2") Fine: 300 µm
Resolution	Coarse: 5.0 µm Fine: 0.5 µm
Coarse Adjustment (with Vernier Scale)	500 µm per rev
Fine Adjustment (with Vernier Scale)	50 µm per rev.

# NEMA 17



## Stepper Motor NEMA 17

This document describes mechanical and electrical specifications for PBC Linear stepper motors; including standard, hollow, and extended shaft variations.

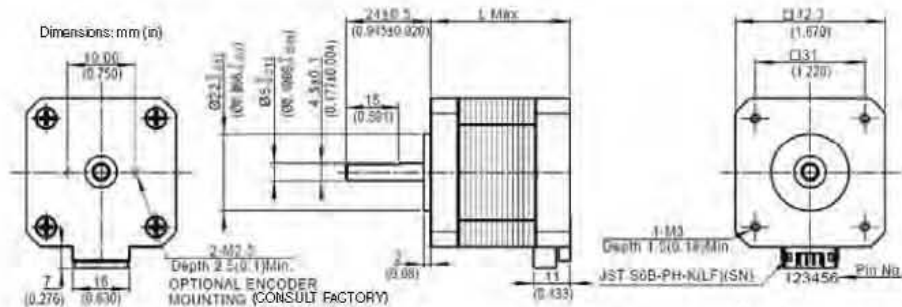


Phases	2
Steps/Revolution	200
Step Accuracy	±5%
Shaft Load	20,000 Hours at 1000 RPM
Axial	25 N (5.8 lbs.) Push
	85 N (19 lbs.) Pull
Radial	29 N (6.5 lbs.) At Flat Center
IP Rating	40
Approvals	RoHS
Operating Temp	-20° C to +40° C
Insulation Class	B, 130° C
Insulation Resistance	100 Meg Ohm s

Standard shaft motor shown.

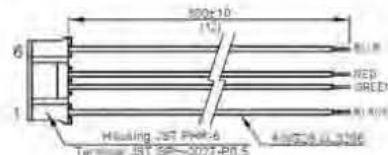
Description	Length	Mounted Rated Current	Mounted Holding Torque		Winding Ohms mH		Detent Torque		Rotor Inertia		Motor Weight	
			Nm oz-in Typ.	oz-in Typ.	±10% @20°C Typ.	mNm oz-in	g cm <sup>2</sup> oz-in <sup>2</sup>	kg lbs	kg lbs			
(Stack)	1" Max	Amps										
Single	38.8 mm (1.57 in)	2	0.48 68	1.04 2.2	15 2.1	57 0.31	0.28 0.62					
Double	48.3 mm (1.90 in)	2	0.63 89	1.3 2.9	25 3.5	82 0.46	0.36 0.79					
Triple	62.8 mm (2.47 in)	2	0.83 120	1.49 3.8	30 4.2	123 0.67	0.6 1.3					

\*All standard motors have plug connector. Consult factory for other options.



Standard shaft dimensions shown. All other dimensions apply to hollow and extended shaft options.

Dimensions: mm (in)  
4 Lead Connector, PBC Part#6200490  
(Consult factory for optional motor connectors)



## Chapter 5 Specifications

### 5.1 General Specifications

Specification	ZFS6	ZFS13/ ZFS13B	ZFS25B
Travel Range	6 mm	13 mm	25 mm
Gear Ratio	400:9 (approx 44:1)		
Lead Screw Pitch	1.0 mm		
Microsteps per revolution of motor (when driven by KST101 Driver)	24 full steps, 2048 $\mu$ steps per full step 49,152 $\mu$ steps per revolution		
Repeatability	<5.0 $\mu$ m		
Home Location Accuracy	<5.0 $\mu$ m		
Backlash	<15 $\mu$ m		
Max Load Capacity	40 N		
Max Speed	3.0 mm/sec		
Max Acceleration	10.0 mm/sec <sup>2</sup>		
Calculated Min. Incremental Motion	0.46 nm		
Motor Type	2 Phase Stepper		
Limit Switches	Hall Effect Sensor		
Operating Temperature	41° to 104° F (5° to 40° C)		
Cable Length	2 ft (0.6 m)		
Connector	HDDB15		
Compatible Controller	KST101 K-Cube Stepper Motor Controller		
<i>*Calculated Resolution. Actual resolution will depend on the applied load</i>			

### 5.2 ZFS Motor Unit Specifications

Specification	ZFS Series
Phase resistance (@ 20°C)	12.5 Ohms
Nominal current per phase (both phases ON)	0.25A
Phase inductance @(1kHz)	6.3 Ohms
Back EMF	4.4V/k step/s

## Appendix C Specifications

### C.1 Specifications

Parameter	Value
<b>Motor Output</b>	
Motor Drive Voltage	12-15 V (Depending on Supply)
Motor Drive Current	750 mA (peak)
Motor Drive Type	12-bit PWM Control
Control Algorithm	Open Loop Microstepping
High Resolution Stepping	2048 Microsteps per Full Step 49,152 Microsteps per Revolution (24 Step Motor) 409600 Microsteps per Revolution (200 Step Motor)
Position Feedback	Quadrature Encoder (QEP) Input, 5 V Differential
Encoder Feedback Bandwidth	500 kHz
Position Counter	32-bit
Operating Modes	Position, Velocity
Velocity Profile	Trapezoidal or 'S' Profile
<b>Motor Drive Connector (15 Way D-Type)</b>	
Motor Drive Outputs	Phase A & B
Quadrature Encoder (QEP) Input	Differential
Limit Switch Inputs	Forward, Reverse (+ Common Return)
Encoder Supply	5 V
<b>Front Panel Controls</b>	
Sprung Potentiometer Wheel	Variable Speed Bidirectional Velocity Control, Forward/Reverse Jogging or Position Presets
<b>Input Power Requirements</b>	
Voltage	12 - 15V Regulated DC (15V recommended)
Current	1 A (peak)
<b>General</b>	
Housing Dimensions (W x D x H) Excluding Buttons and Baseplate	60 x 60 x 47 mm (2.36" x 2.36" x 1.85")
Instrument Weight	140 g (5.0 oz)

Recommended Motor Requirements	
Peak Powers	15 W
Step Angle Range	20° to 1.8°
Rated Phase Current	up to 1 A Peak
Motor Mode	Current
Coil Resistance (nominal)	5 to 20 $\Omega$
Coil Inductance (nominal)	2 to 5.5 mH
Phases	2
Position Control	Open Loop

## 5.1.2 LDC201CU

<b>Current Control (Constant Current Mode)</b>	
Control Range	0 to $\pm 100$ mA
Compliance Voltage	$>5$ V
Resolution	$10$ $\mu$ A
Accuracy	$\pm 50$ $\mu$ A
Noise Without Ripple (10Hz to 10MHz, rms, typ.)	$<0.2$ $\mu$ A
Ripple (50/60Hz, rms, typ.)	$<0.5$ $\mu$ A
Transients (typ.)	$<10$ $\mu$ A
Drift, 24hours (typ., 0-10Hz, at constant ambient temperature)	$<2$ $\mu$ A
Temperature Coefficient	$<50$ ppm/ $^{\circ}$ C
<b>Current Limit</b>	
Setting Range	0 to $>100$ mA
Resolution	$10$ $\mu$ A
Accuracy	$\pm 200$ $\mu$ A
<b>Power Control (Constant Power Mode)</b>	
Photo Current Control Range	$25$ $\mu$ A to $10$ mA
Photo Current Resolution	$1$ $\mu$ A
Photo Current Accuracy	$\pm 10$ $\mu$ A
<b>Analog Modulation Input</b>	
Input Resistance	$10$ k $\Omega$
Small Signal 3dB Bandwidth, CC Mode	DC to $0.2$ kHz
Modulation Coefficient, CC Mode	$10$ mA/V $\pm 5\%$
Modulation Coefficient, CP Mode	$1$ mA/V $\pm 5\%$
<b>Laser Current Monitor Output</b>	
Load Resistance	$>10$ k $\Omega$
Transmission Coefficient	$100$ V/A $\pm 5\%$
<b>General data</b>	
Maximum Power Consumption	$20$ VA
Weight	$<3.1$ kg

All technical data are valid at  $23 \pm 5^{\circ}$ C and  $45 \pm 15\%$  humidity

SPECIFICATIONS

# NI 6343

X Series Data Acquisition: 500 kS/s, 32 AI, 48 DIO, 4 AO

The following specifications are typical at 25 °C, unless otherwise noted. For more information about the NI 6343, refer to the *X Series User Manual* available from [ni.com/manuals](http://ni.com/manuals).

## Analog Input

Number of channels	16 differential or 32 single ended
ADC resolution	16 bits
DNL	No missing codes guaranteed
INL	Refer to the <i>AI Absolute Accuracy</i> section.
Sample rate	
Single channel maximum	500 kS/s
Multichannel maximum (aggregate)	500 kS/s
Minimum	No minimum
Timing resolution	10 ns
Timing accuracy	50 ppm of sample rate
Input coupling	DC
Input range	±0.2 V, ±1 V, ±5 V, ±10 V
Maximum working voltage for analog inputs (signal + common mode)	±11 V of AI GND
CMRR (DC to 60 Hz)	100 dB
Input impedance	
Device on	
AI+ to AI GND	>10 GΩ in parallel with 100 pF
AI- to AI GND	>10 GΩ in parallel with 100 pF



Device off	
AI+ to AI GND	1,200 $\Omega$
AI- to AI GND	1,200 $\Omega$
Input bias current	$\pm 100$ pA
Crosstalk (at 100 kHz)	
Adjacent channels	-75 dB
Non-adjacent channels	-90 dB
Small signal bandwidth (-3 dB)	1.2 MHz
Input FIFO size	2,047 samples
Scan list memory	4,095 entries
Data transfers	
PCIe	DMA (scatter-gather), programmed I/O
USB	USB Signal Stream, programmed I/O
Overvoltage protection for all analog input and sense channels	
Device on	$\pm 25$ V for up to two AI pins
Device off	$\pm 15$ V for up to two AI pins
Input current during overvoltage condition	$\pm 20$ mA max/AI pin

## Settling Time for Multichannel Measurements

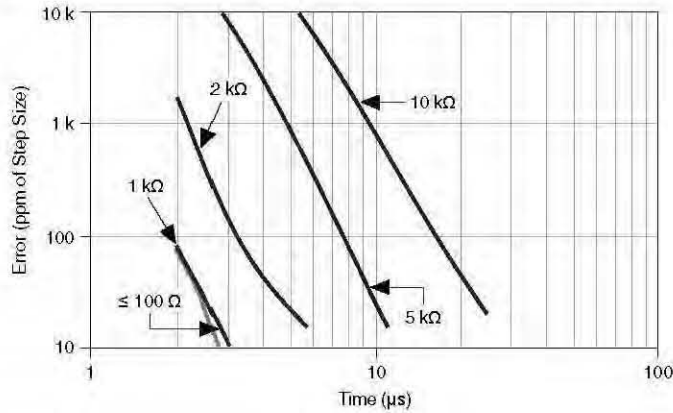
Accuracy, full-scale step, all ranges

$\pm 90$ ppm of step ( $\pm 6$ LSB)	2 $\mu$ s convert interval
$\pm 30$ ppm of step ( $\pm 2$ LSB)	3 $\mu$ s convert interval
$\pm 15$ ppm of step ( $\pm 1$ LSB)	5 $\mu$ s convert interval



## Typical Performance Graph

Figure 1. Settling Error versus Time for Different Source Impedances



## AI Absolute Accuracy

Table 1. AI Absolute Accuracy

Nominal Range Positive Full Scale	Nominal Range Negative Full Scale	Residual Gain Error (ppm of Reading)	Residual Offset Error (ppm of Range)	Offset Tempco (ppm of Range/°C)	Random Noise, $\sigma$ ( $\mu\text{Vrms}$ )	Absolute Accuracy at Full Scale ( $\mu\text{V}$ )
10	-10	65	13	23	270	2,190
5	-5	72	13	23	135	1,130
1	-1	78	17	26	28	240
0.2	-0.2	105	27	39	9	60

For more information about absolute accuracy at full scale, refer to the *AI Absolute Accuracy Example* section.

Gain tempco 7.3 ppm/°C

Reference tempco 5 ppm/°C

INL error 60 ppm of range



**Note** Accuracies listed are valid for up to two years from the device external calibration.

## AI Absolute Accuracy Equation

$$\begin{aligned}
 \text{AbsoluteAccuracy} &= \text{Reading} \cdot (\text{GainError}) + \text{Range} \cdot (\text{OffsetError}) + \text{NoiseUncertainty} \\
 \text{GainError} &= \text{ResidualGainError} + \text{GainTempco} \cdot (\text{TempChangeFromLastInternalCal}) + \\
 &\quad \text{ReferenceTempco} \cdot (\text{TempChangeFromLastExternalCal}) \\
 \text{OffsetError} &= \text{ResidualOffsetError} + \text{OffsetTempco} \cdot (\text{TempChangeFromLastInternalCal}) \\
 &\quad + \text{INLError} \\
 \text{NoiseUncertainty} &= \frac{\text{Random Noise} \cdot 3}{\sqrt{10,000}} \text{ for a coverage factor of } 3\sigma \text{ and averaging} \\
 &\quad 10,000 \text{ points.}
 \end{aligned}$$

## AI Absolute Accuracy Example

Absolute accuracy at full scale on the analog input channels is determined using the following assumptions:

- $\text{TempChangeFromLastExternalCal} = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$
- $\text{TempChangeFromLastInternalCal} = 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- $\text{number\_of\_readings} = 10,000$
- $\text{CoverageFactor} = 3\sigma$

For example, on the 10 V range, the absolute accuracy at full scale is as follows:

$$\begin{aligned}
 \text{GainError} &= 65 \text{ ppm} + 7.3 \text{ ppm} \cdot 1 + 5 \text{ ppm} \cdot 10 = 122 \text{ ppm} \\
 \text{OffsetError} &= 13 \text{ ppm} + 23 \text{ ppm} \cdot 1 + 60 \text{ ppm} = 96 \text{ ppm} \\
 \text{NoiseUncertainty} &= \frac{270 \mu\text{V} \cdot 3}{\sqrt{10,000}} = 8.1 \mu\text{V} \\
 \text{AbsoluteAccuracy} &= 10 \text{ V} \cdot (\text{GainError}) + 10 \text{ V} \cdot (\text{OffsetError}) + \text{NoiseUncertainty} = \\
 &\quad 2,190 \mu\text{V}
 \end{aligned}$$

## Analog Output

Number of channels	4
DAC resolution	16 bits
DNL	±1 LSB
Monotonicity	16 bit guaranteed
Maximum update rate (simultaneous)	
1 channel	900 kS/s
2 channels	840 kS/s per channel <sup>1</sup>

3 channels	775 kS/s per channel
4 channels	719 kS/s per channel
Timing accuracy	50 ppm of sample rate
Timing resolution	10 ns
Output range	±10 V
Output coupling	DC
Output impedance	0.2 Ω
Output current drive	±5 mA
Overdrive protection	±15 V
Overdrive current	15 mA
Power-on state	±20 mV
Power-on/off glitch	
PCIe	2 V for 500 ms
USB	1.5 V for 1.2 <sup>1</sup>
Output FIFO size	8,191 samples shared among channels used
Data transfers	
PCIe	DMA (scatter-gather), programmed I/O
USB	USB Signal Stream, programmed I/O
AO waveform modes	Non-periodic waveform, periodic waveform regeneration mode from onboard FIFO, periodic waveform regeneration from host buffer including dynamic update
Settling time, full-scale step, 15 ppm (1 LSB)	6 μs
Slew rate	15 V/μs
Glitch energy	
Magnitude	100 mV
Duration	2.6 μs

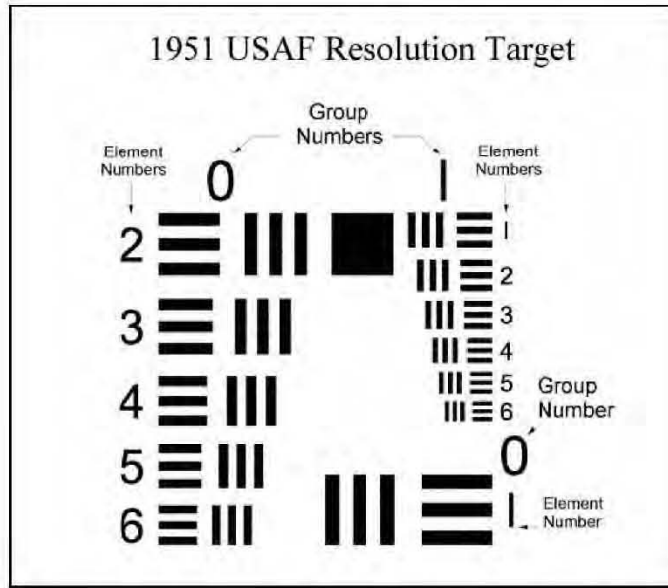
## AO Absolute Accuracy

Absolute accuracy at full-scale numbers is valid immediately following self calibration and assumes the device is operating within 10 °C of the last external calibration.

<sup>1</sup> Typical behavior. Time period may be longer due to host system USB performance. Time period will be longer during firmware updates.

# USAF 1951

1653 East Main Street Rochester, NY 14609 USA Voice: 585.482.0300 FAX: 585.288.5989 imaging@appliedimage.com	T-20 USAF 1951 Chart Standard Layout Product Specifications	<b>APPLIED</b> ® <b>IMAGE</b> Inc 
--	--	---



**1951 USAF Resolution Test Pattern - Group & Element Labels**

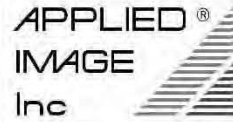
Resolution features of the 1951 USAF Resolution Target are arranged in elements and groups. Each Element is made up of equally spaced bars; three horizontal and three vertical. Groups consist of six elements labeled 1 through 6. Groups are labeled by number in order of increasing frequency.

The figure above shows the location of groups and elements. Note that Element 1 of even numbered Groups is placed in the lower right corner and diagonally opposite Element 2 of the same Group. With this exception, all Elements are arranged in ascending order from top bottom.

The resolution limit of a system is found by examining an image of the resolution test target to locate the Element of highest frequency where either horizontal or vertical lines are not indistinct. Note that the horizontal limit of resolution may indicate a different frequency than the limit of vertical resolution.

1653 East Main Street  
 Rochester, NY 14609 USA  
 Voice: 585.482.0300  
 FAX: 585.288.5989  
 imaging@appliedimage.com

T-20  
 USAF 1951 Chart  
 Standard Layout  
 Product Specifications



Group	Element	Frequency (cycles/mm)	Line or space width (micron)	Line or space width (inches)	DPI (Dots per inch)	PPI (Pixels per inch)	LPPI (line pairs per inch)	Dots per Cm	Lines pairs per Cm
-6	1	0.016	32000	1.259843		0.79	0.40	0.31	0.16
	2	0.018	28509	1.122392		0.89	0.45	0.35	0.18
	3	0.020	25398	0.999938		1.00	0.50	0.39	0.20
	4	0.022	22627	0.890843		1.12	0.56	0.44	0.22
	5	0.025	20159	0.793651		1.26	0.63	0.50	0.25
	6	0.028	17959	0.707063		1.41	0.71	0.56	0.28
-5	1	0.031	16000	0.629921		1.59	0.79	0.63	0.31
	2	0.035	14254	0.561196		1.78	0.89	0.70	0.35
	3	0.039	12699	0.499969		2.00	1.00	0.79	0.39
	4	0.044	11314	0.445422		2.25	1.12	0.88	0.44
	5	0.050	10079	0.396826		2.52	1.26	0.99	0.50
	6	0.056	8980	0.353531		2.83	1.41	1.11	0.56
-4	1	0.063	8000	0.314961		3.18	1.59	1.25	0.63
	2	0.070	7127	0.280598		3.56	1.78	1.40	0.70
	3	0.079	6350	0.249984		4.00	2.00	1.57	0.79
	4	0.088	5657	0.222711		4.49	2.25	1.77	0.88
	5	0.099	5040	0.198413		5.04	2.52	1.98	0.99
	6	0.111	4490	0.176766		5.66	2.83	2.23	1.11
-3	1	0.125	4000	0.157480		6.35	3.18	2.50	1.25
	2	0.140	3564	0.140299		7.13	3.56	2.81	1.40
	3	0.157	3175	0.124992		8.00	4.00	3.15	1.57
	4	0.177	2828	0.111355		8.98	4.49	3.54	1.77

Please contact Applied Image customer service at the address noted above, for custom images, shapes and materials.

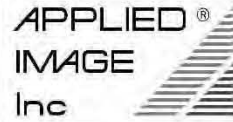
1653 East Main Street Rochester, NY 14609 USA Voice: 585.482.0300 FAX: 585.288.5989 imaging@appliedimage.com	<b>T-20</b> <b>USAF 1951 Chart</b> <b>Standard Layout</b> <b>Product Specifications</b>	
--	--	---

	<b>5</b>	0.198	2520	0.099206		10.08	5.04		3.97	1.98
	<b>6</b>	0.223	2245	0.088383		11.31	5.66		4.45	2.23
<b>-2</b>	<b>1</b>	0.250	2000	0.078740		12.70	6.35		5.00	2.50
	<b>2</b>	0.281	1782	0.070150		14.26	7.13		5.61	2.81
	<b>3</b>	0.315	1587	0.062496		16.00	8.00		6.30	3.15
	<b>4</b>	0.354	1414	0.055678		17.96	8.98		7.07	3.54
	<b>5</b>	0.397	1260	0.049603		20.16	10.08		7.94	3.97
	<b>6</b>	0.445	1122	0.044191		22.63	11.31		8.91	4.45
<b>-1</b>	<b>1</b>	0.500	1000.00	0.039370		25.40	12.70		10.00	5.00
	<b>2</b>	0.561	890.90	0.035075		28.51	14.26		11.22	5.61
	<b>3</b>	0.630	793.70	0.031248		32.00	16.00		12.60	6.30
	<b>4</b>	0.707	707.11	0.027839		35.92	17.96		14.14	7.07
	<b>5</b>	0.794	629.96	0.024802		40.32	20.16		15.87	7.94
	<b>6</b>	0.891	561.23	0.022096		45.26	22.63		17.82	8.91
<b>0</b>	<b>1</b>	1.000	500.00	0.019685		50.80	25.40		20.00	10.00
	<b>2</b>	1.122	445.45	0.017537		57.02	28.51		22.45	11.22
	<b>3</b>	1.260	396.85	0.015624		64.00	32.00		25.20	12.60
	<b>4</b>	1.414	353.55	0.013919		71.84	35.92		28.28	14.14
	<b>5</b>	1.587	314.98	0.012401		80.64	40.32		31.75	15.87
	<b>6</b>	1.782	280.62	0.011048		90.52	45.26		35.64	17.82
<b>1</b>	<b>1</b>	2.000	250.00	0.009843		101.60	50.80		40.00	20.00
	<b>2</b>	2.245	222.72	0.008769		114.04	57.02		44.90	22.45
	<b>3</b>	2.520	198.43	0.007812		128.01	64.00		50.40	25.20
	<b>4</b>	2.828	176.78	0.006960		143.68	71.84		56.57	28.28
	<b>5</b>	3.175	157.49	0.006200		161.28	80.64		63.50	31.75
	<b>6</b>	3.564	140.31	0.005524		181.03	90.52		71.27	35.64

*Please contact Applied Image customer service at the address noted above, for custom images, shapes and materials.*

1653 East Main Street  
 Rochester, NY 14609 USA  
 Voice: 585.482.0300  
 FAX: 585.288.5989  
 imaging@appliedimage.com

T-20  
 USAF 1951 Chart  
 Standard Layout  
 Product Specifications



Group	Element	Frequency (cycles/mm)	Line or space width (micron)	Line or space width (inches)	DPI (Dots per inch)	PPI (Pixels per inch)	LPPI (line pairs per inch)	Dots per Cm	Lines pairs per Cm
2	1	4.00	125.00	0.004921	203.20	101.60		80.00	40.00
	2	4.49	111.36	0.004384	228.08	114.04		89.80	44.90
	3	5.04	99.21	0.003906	256.02	128.01		100.79	50.40
	4	5.66	88.39	0.003480	287.37	143.68		113.14	56.57
	5	6.35	78.75	0.003100	322.56	161.28		126.99	63.50
	6	7.13	70.15	0.002762	362.06	181.03		142.54	71.27
3	1	8.00	62.50	0.002461	406.40	203.20		160.00	80.00
	2	8.98	55.68	0.002192	456.17	228.08		179.59	89.80
	3	10.08	49.61	0.001953	512.03	256.02		201.59	100.79
	4	11.31	44.19	0.001740	574.74	287.37		226.27	113.14
	5	12.70	39.37	0.001550	645.12	322.56		253.98	126.99
	6	14.25	35.08	0.001381	724.12	362.06		285.09	142.54
4	1	16.00	31.25	0.001230	812.80	406.40		320.00	160.00
	2	17.96	27.84	0.001096	912.34	456.17		359.19	179.59
	3	20.16	24.80	0.000977	1024.06	512.03		403.17	201.59
	4	22.63	22.10	0.000870	1149.47	574.74		452.55	226.27
	5	25.40	19.69	0.000775	1290.24	645.12		507.97	253.98
	6	28.51	17.54	0.000690	1448.24	724.12		570.18	285.09
5	1	32.00	15.63	0.000615	1625.60	812.80		640.00	320.00
	2	35.92	13.92	0.000548	1824.67	912.34		718.38	359.19
	3	40.32	12.40	0.000488	2048.13	1024.06		806.35	403.17
	4	45.25	11.05	0.000435	2298.95	1149.47		905.10	452.55

Please contact Applied Image customer service at the address noted above, for custom images, shapes and materials.

1653 East Main Street Rochester, NY 14609 USA Voice: 585.482.0300 FAX: 585.288.5989 imaging@appliedimage.com	<b>T-20</b> <b>USAF 1951 Chart</b> <b>Standard Layout</b> <b>Product Specifications</b>	
--	--	---

	<b>5</b>	50.80	9.84	0.000388		2580.48	1290.24		1015.94	507.97
	<b>6</b>	57.02	8.77	0.000345		2896.49	1448.24		1140.35	570.18
<b>6</b>	<b>1</b>	64.00	7.81	0.000308		3251.20	1625.60		1280.00	640.00
	<b>2</b>	71.84	6.96	0.000274		3649.35	1824.67		1436.75	718.38
	<b>3</b>	80.63	6.20	0.000244		4096.26	2048.13		1612.70	806.35
	<b>4</b>	90.51	5.52	0.000217		4597.89	2298.95		1810.19	905.10
	<b>5</b>	101.59	4.92	0.000194		5160.96	2580.48		2031.87	1015.94
	<b>6</b>	114.04	4.38	0.000173		5792.98	2896.49		2280.70	1140.35
<b>7</b>	<b>1</b>	128.00	3.91	0.000154		6502.40	3251.20		2560.00	1280.00
	<b>2</b>	143.68	3.48	0.000137		7298.70	3649.35		2873.50	1436.75
	<b>3</b>	161.27	3.10	0.000122		8192.51	4096.26		3225.40	1612.70
	<b>4</b>	181.02	2.76	0.000109		9195.78	4597.89		3620.39	1810.19
	<b>5</b>	203.19	2.46	0.000097		10321.92	5160.96		4063.75	2031.87
	<b>6</b>	228.07	2.19	0.000086		11585.96	5792.98		4561.40	2280.70
<b>8</b>	<b>1</b>	256.00	1.95	0.000077		13004.80	6502.40		5120.00	2560.00
	<b>2</b>	287.35	1.74	0.000069		14597.39	7298.70		5747.01	2873.50
	<b>3</b>	322.54	1.55	0.000061		16385.02	8192.51		6450.80	3225.40
	<b>4</b>	362.04	1.38	0.000054		18391.56	9195.78		7240.77	3620.39
	<b>5</b>	406.37	1.23	0.000048		20643.83	10321.92		8127.49	4063.75
	<b>6</b>	456.14	1.10	0.000043		23171.92	11585.96		9122.80	4561.40
<b>9</b>	<b>1</b>	512.00	0.98	0.000038		26009.60	13004.80		10240.00	5120.00
	<b>2</b>	574.70	0.87	0.000034		29194.79	14597.39		11494.01	5747.01
	<b>3</b>	645.08	0.78	0.000031		32770.04	16385.02		12901.59	6450.80
	<b>4</b>	724.08	0.69	0.000027		36783.13	18391.56		14481.55	7240.77
	<b>5</b>	812.75	0.62	0.000024		41287.67	20643.83		16254.99	8127.49
	<b>6</b>	912.28	0.55	0.000022		46343.84	23171.92		18245.61	9122.80

Please contact Applied Image customer service at the address noted above, for custom images, shapes and materials.



## Apéndice B: Programa de Filtros Espaciales

```
%FILTROS

%*****Lectura y Ruido*****
Chaos=uint8(imread('ImagenAFiltrar.bmp','bmp'));
Chaos=Chaos(:,:,1);
Chaosr = imnoise(Chaos,'gaussian');%Ruido

%*****Filtros Suav.*****
f3x3=(1/9)*ones(3,3);
f5x5=(1/25)*ones(5,5);
f7x7=(1/49)*ones(7,7);
f11x11=(1/121)*ones(11,11);

%*****Aplicación Convoluciones*****
su_3x3=conv2(f3x3,Chaos);
su_3x3r=conv2(f3x3,Chaosr);%RUIDO
su_5x5=conv2(f5x5,Chaos);
su_5x5r=conv2(f5x5,Chaosr);
su_7x7=conv2(f7x7,Chaos);
su_7x7r=conv2(f7x7,Chaosr);
su_11x11=conv2(f11x11,Chaos);
su_11x11r=conv2(f11x11,Chaosr);

%*****Filtros R. de Ruido*****
fbin3x3=([1;2;1]*[1 2 1]);
fbin5x5=([1;4;6;4;1]*[1 4 6 4 1]);
fbin7x7=([1;6;15;20;15;6;1]*[1 6 15 20 15 6 1]);
fbin11x11=([1;10;45;120;210;252;210;120;45;10;1]*[1 10 45 120 210 252 210
120 45 10 1]);

%*****Aplicación Convoluciones*****
rr_3x3=conv2(fbin3x3,Chaos);
rr_3x3r=conv2(fbin3x3,Chaosr);
rr_5x5=conv2(fbin5x5,Chaos);
rr_5x5r=conv2(fbin5x5,Chaosr);
rr_7x7=conv2(fbin7x7,Chaos);
rr_7x7r=conv2(fbin7x7,Chaosr);
rr_11x11=conv2(fbin11x11,Chaos);
rr_11x11r=conv2(fbin11x11,Chaosr);

%*****Filtros D. de Bordes Gauss*****
filblope=[1 -1];%Detector de bordes
filprewx=[1 0 -1;1 0 -1;1 0 -1];%Filtro prewitt X
filprewy=[1 1 1;0 0 0;-1 -1 -1];%Filtro prewitt Y
filsobelx=[1 0 -1;2 0 -2;1 0 -1];%Filtro sobel X
filsobely=[1 2 1;0 0 0;-1 -2 -1];%Filtro sobel Y

%*****Derivadas Gaussianas*****
```

```

fdgau5x5=[1;4;6;4;1]*[1 2 0 -2 -1];
fdgau5x5y=[1;2;0;-2;-1]*[1 4 6 4 1];
fdgau7x7=[1;6;15;20;15;6;1]*[1 4 5 0 -5 -4 -1];
fdgau7x7y=[1;4;5;0;-5;-4;-1]*[1 6 15 20 15 6 1];
fdgau11x11=[1;10;45;120;210;252;210;120;45;10;1]*[1 8 27 48 42 0 -42 -48
-27 -8 -1];
fdgau11x11y=[1;8;27;48;42;0;-42;-48;-27;-8;-1]*[1 10 45 120 210 252 210
120 45 10 1];

%*****Aplicación Convoluciones*****
ddb_bloque=conv2(filbloque,Chaos);
ddb_bloquer=conv2(filbloque,Chaosr);
ddb_prewx=conv2(filprewx,Chaos);
ddb_prewxr=conv2(filprewx,Chaosr);
ddb_prewy=conv2(filprewy,Chaos);
ddb_prewyr=conv2(filprewy,Chaosr);
ddb_sobelx=conv2(filsobelx,Chaos);
ddb_sobelxr=conv2(filsobelx,Chaosr);
ddb_sobely=conv2(filsobely,Chaos);
ddb_sobelyr=conv2(filsobely,Chaosr);
ddb_dgau5x5=conv2(fdgau5x5,Chaos);
ddb_dgau5x5r=conv2(fdgau5x5,Chaosr);
ddb_dgau7x7=conv2(fdgau7x7,Chaos);
ddb_dgau7x7r=conv2(fdgau7x7,Chaosr);
ddb_dgau11x11=conv2(fdgau11x11,Chaos);
ddb_dgau11x11r=conv2(fdgau11x11,Chaosr);

%*****Detectores de Bordes
Laplace*****
%*****Filtros*****
fillaplace=[2 0 2;0 -8 0;2 0 2];%laplaciano (en segunda derivada
gaussiana)

fddgau5x5=[1;4;6;4;1]*[1 0 -2 0 1];
fddgau5x5y=[1;0;-2;0;1]*[1 4 6 4 1];
fddgau7x7=[1;6;15;20;15;6;1]*[1 2 -1 -4 -1 2 1];
fddgau7x7y=[1;2;-1;-4;-1;2;1]*[1 6 15 20 15 6 1];
fddgau11x11=[1;10;45;120;210;252;210;120;45;10;1]*[1 6 13 8 -14 -28 -14 8
13 6 1];
fddgau11x11y=[1;6;13;8;-14;-28;-14;8;13;6;1]*[1 10 45 120 210 252 210 120
45 10 1];

%*****Aplicación Convoluciones*****
ddb_laplace=conv2(fillaplace,Chaos);
ddb_laplacer=conv2(fillaplace,Chaosr);
ddb_ddgau5x5=conv2(fddgau5x5,Chaos);
ddb_ddgau5x5r=conv2(fddgau5x5,Chaosr);
ddb_ddgau7x7=conv2(fddgau7x7,Chaos);
ddb_ddgau7x7r=conv2(fddgau7x7,Chaosr);
ddb_ddgau11x11=conv2(fddgau11x11,Chaos);
ddb_ddgau11x11r=conv2(fddgau11x11,Chaosr);

%*****Unsharp*****
%*****Filtros*****
k=3;

```

```

dxy3 = [0 0 0;0 1+k 0;0 0 0];
dxy7 = [0 0 0 0 0 0 0;0 0 0 0 0 0 0;0 0 0 0 0 0 0;0 0 0 1+k 0 0 0;0 0 0 0
0 0 0;0 0 0 0 0 0 0;0 0 0 0 0 0 0];
fumb3 = dxy3 - f3x3;
fumb7 = dxy7 - f7x7;
unfbin3x3=(1/16)*([1;2;1]*[1 2 1]);
unfbin7x7=(1/4096)*([1;6;15;20;15;6;1]*[1 6 15 20 15 6 1]);
fumbin3 = dxy3 - unfbin3x3;
fumbin7 = dxy7 - unfbin7x7;
%*****Aplicación Convoluciones*****
fin1 = conv2(fumb3,su_3x3);
fin1r = conv2(fumb3,su_3x3r);
fin2 = conv2(fumb7,su_7x7);
fin2r = conv2(fumb7,su_7x7r);

un_3x3=conv2(unfbin3x3,Chaos);
un_3x3r=conv2(unfbin3x3,Chaosr);
fin3 = conv2(fumbin3,un_3x3);
fin3r = conv2(fumbin3,un_3x3r);
un_7x7=conv2(unfbin7x7,Chaos);
un_7x7r=conv2(unfbin7x7,Chaosr);
fin4 = conv2(fumbin7,un_7x7);
fin4r = conv2(fumbin7,un_7x7r);

%*****Despliegues*****
%*****Originales*****
figure(1);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(Chaos);title('Imagen original');
figure(2);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(Chaosr);title('Imagen con ruido');
%*****Bloque*****
figure(3);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(su_3x3);title('Imagen con filtro de bloque 3x3');
figure(4);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(su_3x3r);title('Imagen con ruido con filtro de
bloque 3x3');
figure(5);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(su_5x5);title('Imagen con filtro de bloque 5x5');
figure(6);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(su_5x5r);title('Imagen con ruido con filtro de
bloque 5x5');
figure(7);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(su_7x7);title('Imagen con filtro de bloque 7x7');
figure(8);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(su_7x7r);title('Imagen con ruido con filtro de
bloque 7x7');
figure(9);
colormap(gray(64));

```

```

subplot(1,1,1);imagesc(su_11x11);title('Imagen con filtro de bloque
11x11');
figure(10);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(su_11x11r);title('Imagen con ruido con filtro de
bloque 11x11');
%*****Binomial*****
figure(11);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_3x3);title('Imagen con filtro binomial 3x3');
figure(12);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_3x3r);title('Imagen con ruido con filtro
binomial 3x3');
figure(13);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_5x5);title('Imagen con filtro binomial 5x5');
figure(14);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_5x5r);title('Imagen con ruido con filtro
binomial 5x5');
figure(15);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_7x7);title('Imagen con filtro binomial 7x7');
figure(16);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_7x7r);title('Imagen con ruido con filtro
binomial 7x7');
figure(17);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_11x11);title('Imagen con filtro binomial
11x11');
figure(18);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_11x11r);title('Imagen con ruido con filtro
binomial 11x11');
%*****Bordes*****
figure(19);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_dgau5x5);title('Imagen con filtro primera
derivada Gaussiana 5x5');
figure(20);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_dgau5x5r);title('Imagen con ruido con filtro
primera derivada Gaussiana 5x5');
figure(21);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_dgau7x7);title('Imagen con filtro primera
derivada Gaussiana 7x7');
figure(22);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_dgau7x7r);title('Imagen con ruido con filtro
primera derivada Gaussiana 7x7');
figure(23);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_dgau11x11);title('Imagen con filtro primera
derivada Gaussiana 11x11');

```

```

figure(24);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_dgau11x11r);title('Imagen con ruido con filtro
primera derivada Gaussiana 11x11');
figure(25);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_laplace);title('Imagen con filtro
Laplaciano');
figure(26);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_laplacer);title('Imagen con ruido con filtro
Laplaciano');
figure(27);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_ddgau5x5);title('Imagen con filtro segunda
derivada Gaussiana de 5x5');
figure(28);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_ddgau5x5r);title('Imagen con ruido con filtro
segunda derivada Gaussiana de 5x5');
figure(29);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_ddgau7x7);title('Imagen con filtro segunda
derivada Gaussiana de 7x7');
figure(30);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_ddgau7x7r);title('Imagen con ruido con filtro
segunda derivada Gaussiana de 7x7');
figure(31);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_ddgau11x11);title('Imagen con filtro segunda
derivada Gaussiana de 11x11');
figure(32);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(ddb_ddgau11x11r);title('Imagen con ruido con
filtro segunda derivada Gaussiana de 11x11');
% %*****Unsharp*****
figure(33);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(su_3x3);title('Imagen con filtro bloque 3x3');
figure(34);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(su_3x3r);title('Imagen con ruido con filtro bloque
3x3');
figure(35);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(fin1);title('Imagen con filtro UM de bloque 3x3');
figure(36);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(fin1r);title('Imagen con ruido con filtro UM de
bloque 3x3');

figure(37);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(su_7x7);title('Imagen con filtro bloque 7x7');
figure(38);
colormap(gray(64));

```

```

subplot(1,1,1);imagesc(su_7x7r);title('Imagen con ruido con filtro bloque
7x7');
figure(39);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(fin2);title('Imagen con filtro UM de bloque 7x7');
figure(40);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(fin2r);title('Imagen con ruido con filtro UM de
bloque 7x7');

figure(41);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_3x3);title('Imagen con filtro binomial 3x3');
figure(42);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_3x3r);title('Imagen con ruido con filtro
binomial 3x3');
figure(43);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(fin3);title('Imagen con filtro UM binomial 3x3');
figure(44);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(fin3r);title('Imagen con ruido con filtro UM
binomial 3x3');

figure(45);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_7x7);title('Imagen con filtro binomial 7x7');
figure(46);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(rr_7x7r);title('Imagen con ruido con filtro
binomial 7x7');
figure(47);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(fin4);title('Imagen enfocada con filtro UM
binomial 7x7');
figure(48);
colormap(gray(64));
subplot(1,1,1);imagesc(fin4r);title('Imagen con ruido con filtro UM
binomial 7x7');

```

### Apéndice C: Sistema de barrido utilizando los ZFS13B

El algoritmo de funcionamiento de este sistema está descrito de la siguiente forma:

1. Se ingresan datos:
  - a. Posición inicial del motor X y el motor Y.
  - b. Número de pixeles que tendrá la imagen en X y en Y.
  - c. El tamaño del paso del motor X y del motor Y.
  - d. La dirección en la que se desplazará el motor X y el motor Y.
  - e. Retardo entre cada medición.
2. Se inicializan los controladores de los motores X y Y.
3. Los motores se trasladan a la posición inicial.
4. Se habilita una entrada en la tarjeta de adquisición para la señal del fotodiodo.
5. Se crea una matriz Z del tamaño de pixeles ingresado.
6. El motor X da un paso.
7. Se lee la señal del fotodiodo y se mapea en  $Z[i][j]$ .
8. Repite 6 y 7 hasta que el número de pixeles almacenados en X sea igual al número de pixeles solicitados.
9. El motor X regresa a la posición inicial.
10. El motor Y da un paso.
11. Repite de 6 a 10 hasta que el número de pixeles almacenados en Y sea igual al número de pixeles solicitados.
12. El motor Y regresa a la posición inicial.
13. Los datos almacenados en Z se guardan en un documento .txt.

La tabla de calibración de este sistema es:

Paso Teórico	Paso Real
10 $\mu\text{m}$	10.4 $\mu\text{m}$
5 $\mu\text{m}$	5.4 $\mu\text{m}$
2 $\mu\text{m}$	2.54 $\mu\text{m}$
1 $\mu\text{m}$	0.9 $\mu\text{m}$
500 nm	477 nm
200 nm	215.9 nm
100 nm	118.18 nm
50 nm	58.18 nm

**Tabla C.1.** Escala de calibración del dispositivo.