

# **La luz sobre el micromundo: un laboratorio en un chip**

por  
**Karen Volke**

Este es un capítulo separado que integra el libro

## **Fronteras de la Física en el Siglo XXI**

**Octavio Miramontes y Karen Volke** (Editores)

CopIt-arXives, 2013

México, D.F.

ISBN: 978-1-938128-03-5

©CopIt-arXives

<http://scifunam.fisica.unam.mx/mir/copit/TS0011ES/TS0011ES.html>

# Índice general

Karen Volke	<b>La luz sobre el micromundo: Un laboratorio en un chip</b>	<b>1</b>
1.	De la miniaturización tecnológica al Lab-en-un-Chip . . . . .	1
2.	La micromanipulación con luz . . . . .	5
3.	Retos y avances en las técnicas de detección . . . . .	14
4.	Investigación multidisciplinaria y sistemas integrados . . . . .	21
5.	Referencias . . . . .	24

# La luz sobre el micromundo: Un laboratorio en un chip

Karen Volke, Instituto de Física, UNAM, México

*Todo lo que un hombre pueda imaginar, otros podrán hacerlo realidad.*  
Julio Verne

El término *micro*, inicialmente se refería a aquellos objetos que por su tamaño escapan a la resolución de nuestro ojo desnudo, pero hoy en día la frontera de lo que podemos llegar a *ver* ha sido extendida hasta límites en otros tiempos inimaginables, incluso con la posibilidad de observar procesos dinámicos con resolución temporal. En este vertiginoso avance hacia la exploración de lo *pequeño*, la óptica ha jugado un papel crucial. Esta área de la física, que es de las más antiguas, actualmente vuelve a ocupar un lugar privilegiado entre los temas más efervescentes, con enorme actividad tanto en investigación básica como aplicada. De hecho, las aplicaciones de la óptica trascienden ampliamente las fronteras de la física; pocas áreas científicas han tenido tanto impacto en el desarrollo tecnológico, desde dispositivos de uso cotidiano hasta herramientas fundamentales para otras disciplinas científicas. En este sentido, la labor de un físico especializado en óptica tiene grandes posibilidades de ser multidisciplinaria. Este capítulo está dedicado a describir algunas de las tecnologías ópticas modernas para manipular y observar objetos microscópicos, así como el camino hacia el desarrollo de sistemas *fotónicos* integrados. Tanto los principios físicos como las aplicaciones resultan fascinantes y es, indudablemente, parte importante de la física de frontera en el nuevo siglo.

## 1. De la miniaturización tecnológica al Lab-en-un-Chip

Las nuevas generaciones de jóvenes no han conocido, mas que si acaso como pieza en algún museo, los antiguos y voluminosos televisores y los primeros teléfonos celulares, o las primeras computadoras que podían ocupar habitaciones completas. Los aparatosos circuitos con alambre y resistencias, los bulbos, los cañones de electrones, todo eso quedó atrás ante los circuitos integrados. Mas aún, la hoy compacta electrónica basada en

silicio pronto quedará obsoleta ante la electrónica con base en grafeno, que promete ser aún más compacta, y la electrónica en sí, será eventualmente reemplazada por la fotónica.

El desarrollo de los circuitos integrados (CI) inició durante la década de los 50 (Jack Kilby compartió el premio Nobel en el 2000 por la invención del primer CI, que data de 1958), aunque salieron al mercado hasta 1961 [1]. Este invento fue una de las innovaciones más revolucionarias en la historia de la humanidad desde el punto de vista tecnológico, y con mayores repercusiones a nivel económico y comercial. De hecho, la evolución de la electrónica hacia la integración y la miniaturización ha sido también un ejemplo a seguir para otras áreas científicas y tecnológicas, sirviendo no sólo de inspiración, sino empujando hacia nuevas técnicas y materiales para los procesos de micromaquinado, que han sido la base para micro-dispositivos modernos. Por ejemplo, un proceso de fabricación típico para circuitos integrados y que resulta extremadamente costeable es la fotolitografía, que involucra varios pasos. Primero, sobre un sustrato u *oblea* de material semiconductor previamente tratado para eliminar cualquier contaminante, se deposita y se fija por calentamiento una película de resina fotosensible, que posteriormente se expone de manera selectiva a la luz mediante la proyección de una mascarilla opaca con la forma o patrón deseado. La frecuencia de la luz que ilumina la mascarilla es tal (generalmente UV) que cambia las propiedades químicas del material expuesto, lo que permite remover por ataque químico, ya sea el material expuesto (fotoresistente positivo) o el que no recibió luz (fotoresistente negativo) para *revelar* así el patrón impreso sobre el sustrato, y que también se fija por calentamiento. De hecho, se puede distinguir entre el micromaquinado de volumen y el de superficie. Mientras que en el primero se usa todo el espesor del sustrato semiconductor y se remueve el material que no se usará, en el segundo se usan capas de material depositado sobre el sustrato en lugar del sustrato en si. Cada capa se puede moldear por separado de manera sucesiva, lo que permite realizar estructuras monolíticas en tres dimensiones. En cualquier caso, lo más caro del micromaquinado es el requerimiento de un *cuarto limpio*, con niveles extremos de pureza del aire, ya que en la impresión de circuitos con dimensiones características de micrómetros o incluso de nanómetros, la presencia de la más nimia partícula de polvo puede arruinar el patrón resultante. Sin embargo, al aplicar la fabricación en serie de grandes volúmenes, el costo de esa facilidad se diluye.

Con estas bases bien establecidas, en los 80 se comenzaron a desarrollar los MEMS, acrónimo en inglés de *sistemas micro-electro-mecánicos*, también conocidos como *micro-máquinas* (en Japón) o *Tecnología de Micro-Sistemas* (en Europa). Estos son dispositivos en miniatura, entre 10 y 1000 micras de tamaño total, con componentes cuyos tamaños van de 1 a 100 micras, que se integran para formar un sistema más complejo, capaz de realizar una función específica. Generalmente se usan como sensores y/o actuadores, incorporados en sistemas de mayor tamaño que realizan funciones de más alto nivel. Han permeado en diversos ámbitos, especialmente en el automotriz, médico, industrial y aeroespacial. Por ejemplo, los sensores de presión e inerciales y los acelerómetros se han incorporado

en los mecanismos que detonan las bolsas de aire en los automóviles [2].

Si bien los MEMS constituyen una tecnología revolucionaria que ya forma parte de nuestra vida cotidiana, aun no han alcanzado el impacto económico proyectado durante su época auge en los 90. Esto es debido a una falta de estandarización, ya que hay componentes de muy diversos tipos para diferentes aplicaciones y los volúmenes de fabricación en serie no resultan en general suficientemente altos como para diluir el costo de producción [2]. Esto conduce, una vez más, a empujar el progreso de los métodos de fabricación y el uso de nuevos materiales. Así, los MEMS que se fabrican con polímeros por medio de procesos como el moldeado por inyección o, más recientemente, la polimerización por absorción de dos fotones [3], pueden resultar más baratos que aquellos que se hacen con estereolitografía (aplicación sucesiva de fotolitografía por capas), o que los fabricados con materiales cerámicos, cuyas propiedades los hacen aptos para ciertas aplicaciones. Pero a fin de cuentas, la incorporación de MEMS en un dispositivo se justifica no sólo con base en la reducción de costos de fabricación, sino también cuando éstos realizan una función novedosa, o cuando la reducción de tamaño es en sí lo que hace útil a un dispositivo. Incluso hoy en día ya se habla de NEMS (sistemas nano-electro-mecánicos) y de nanofotónica. Los NEMS se han materializado desde principios de este siglo, principalmente en forma de *cantilevers*<sup>1</sup>.

Otro producto de la miniaturización es la micro-óptica. En este caso, el objetivo fue reducir el tamaño de componentes ópticos, desde lentes, espejos, polarizadores, prismas y divisores de haz, hasta fuentes de luz láser y detectores, ya fuera para formar parte de sistemas de transmisión y procesamiento de información, o para sistemas de imagen y detección capaces de acceder a espacios limitados. Es común encontrar arreglos de microlentes o microespejos, a manera de matriz, que se integran a dispositivos macro, como en el caso de los sistemas de microespejos que se encuentran en algunos proyectores comerciales. En este contexto, el desarrollo de los cristales fotónicos también ha sido importante. éstos son estructuras periódicas, con periodos en el orden de nanómetros, fabricadas a imitación de los cristales semiconductores naturales, pero que en lugar de bandas electrónicas de energías prohibidas y permitidas, tienen *bandas fotónicas*, es decir, rangos de frecuencia de la luz que puede o no propagarse dentro del material. Al introducir *defectos* en un cristal fotónico en forma de cavidades o en forma de líneas, se pueden generar microresonadores o guías de onda a manera de circuitos, respectivamente, que *atrapan* la luz imposibilitada para viajar en el resto del material. La integración de circuitos fotónicos es un área joven, aún en etapa de investigación, pero ya hay dispositivos comerciales como las fibras fotónicas.

---

<sup>1</sup>Un cantilever es una pequeña palanca fija por uno de sus extremos y con una punta muy fina en el otro, perpendicular al brazo de la palanca. Se usa en microscopios de fuerza atómica por ejemplo; la fuerza ejercida por los átomos de la superficie explorada sobre la punta hace que la palanca se deflece y un haz de luz reflejado en su superficie cuantifica la deflexión.

La convergencia entre micro-óptica y MEMS, dio lugar a los primeros MOEMS (acrónimo en inglés de sistemas micro-opto-electro-mecánicos). Muestras de estos dispositivos son los proyectores y pantallas digitales, toda una familia de conmutadores ópticos para telecomunicaciones, filtros sintonizables para sistemas de multiplexado en frecuencia y micro-escáneres, entre otros.

Con la misma filosofía de reescalamiento y con el interés de aplicar el principio al análisis químico, biológico, médico, bioquímico, y biotecnológico, un nuevo protagonista de las miniaturas apareció hacia finales de los 90: los sistemas LOC, acrónimo en inglés de lab-on-a-chip, o en español, *lab-en-un-chip*. Como su nombre lo indica, la idea es llevar la investigación que se realiza en un laboratorio a un dispositivo del tamaño de un chip, capaz de realizar múltiples funciones. Herramientas como la micromanipulación óptica y una diversidad de técnicas modernas de microscopía, que se discutirán con mayor detalle en las próximas secciones, junto con otras técnicas como espectroscopía Raman y micro-fluídica, son bloques constitutivos de los sistemas LOC.

Sin embargo, es importante mencionar que hay muchos retos asociados al micro- y nano-escalamiento, algunos de los cuales fueron señalados desde 1959 por Richard Feynmann, en su célebre, visionaria e inspiradora conferencia “There’s plenty of room at the bottom” (Hay mucho lugar al fondo). Ahí Feynmann evocó un divertimento que le fue compartido por Albert Hibbs sobre la posibilidad de *tragarse al cirujano*, es decir, un sistema médico de control remoto que pudiera tratar una enfermedad desde el interior del paciente, y se preguntó por los problemas de construir máquinas en miniatura. Mientras los efectos físicos de gran escala, como la inercia y el peso, pueden resultar insignificantes, los efectos de superficie dominan sobre los efectos de volumen a pequeña escala, como la tensión superficial y la cohesión. Previó también problemas asociados a la estructura *granular* de un medio a escala atómica<sup>2</sup>, y con el escalamiento de materiales magnéticos, que funcionan con base en dominios. Así mismo, reconoció que al trabajar con unos pocos átomos, los efectos cuánticos serán predominantes, por lo que habrá que aplicar las leyes cuánticas en lugar de las clásicas. Todas estas consideraciones son hoy en día muy familiares entre los científicos dedicados a la nanotecnología<sup>3</sup>. De hecho, la mayoría de los pronósticos de Feynman se han hecho realidad al paso de los años.

---

<sup>2</sup>En este punto reconoció que el vidrio y plástico, por ser amorfos, serían mucho mejores candidatos para construir máquinas en miniatura.

<sup>3</sup>Ver el capítulo “Física a la escala nanométrica” de este libro.

## 2. La micromanipulación con luz

Tanto desde el punto de vista de la teoría electromagnética, como desde la perspectiva de la mecánica cuántica, se concluye que la luz porta energía y momento lineal, cantidades ambas que se conservan en cualquier proceso de interacción entre radiación y materia. La transferencia de momento lineal se traduce en que la luz es capaz de ejercer presión sobre la materia, aunque es tan débil<sup>4</sup>, que resulta insignificante al actuar sobre objetos macroscópicos. Sin embargo, la presión que ejerce la luz de un láser puede llegar a ser muy importante al actuar sobre objetos suficientemente pequeños. A diferencia de la radiación policromática, como la que recibimos del sol, la luz emitida por un láser es cuasi-monocromática, *coherente*<sup>5</sup> y altamente direccional, además de ser muy intensa (gran potencia por unidad de área). En óptica nos referimos a este tipo de propagación como un haz de luz. Como ejemplo, en un haz de luz láser de 1 Watt de potencia enfocado a un punto de unas 10 micras de diámetro, la cantidad de fotones que atraviesan esa área por unidad de tiempo es más de nueve millones de veces superior a la cantidad de fotones provenientes del sol que atraviesan un área del mismo tamaño localizada justo en el exterior de la atmósfera terrestre.

Con base en este tipo de argumentos, en 1970 un científico estadounidense llamado Arthur Ashkin diseñó un experimento para medir la presión de radiación ejercida por un láser continuo. Para minimizar efectos de absorción utilizó esferas transparentes de látex suspendidas en agua, con diámetros que iban desde fracciones de micra hasta unas pocas micras. Entonces ocurrió una serendipia (descubrimiento fortuito); no sólo encontró que la presión de radiación propulsaba a las partículas en la dirección de propagación del láser (en ese caso horizontal), como esperaba, sino que también observó que éstas eran atraídas hacia las regiones de mayor intensidad de la luz. Es decir, en lugar de que las partículas fueran cayendo mientras eran empujadas por la luz, permanecían siempre centradas con respecto al eje del haz. Con base en este sorpresivo y excitante hallazgo, Ashkin tuvo la idea de atrapar una partícula utilizando dos haces de luz propagándose en direcciones opuestas, de modo que la presión ejercida por cada uno de ellos se equilibrara entre sí en algún punto [4]. Así nació lo que hoy es una de las áreas de mayor impacto en la ciencia y la tecnología: la manipulación de materia con luz.

En la década de los 70 y principios de los 80, la atención de los científicos que exploraban esta nueva área se enfocó en comprender mejor los fundamentos físicos del fenómeno y en el desarrollo de técnicas para capturar partículas de diferentes materiales, formas y

---

<sup>4</sup>Por ejemplo, la presión de la radiación solar en la superficie terrestre es aproximadamente  $10^{-11}$  veces menor que la presión atmosférica.

<sup>5</sup>La coherencia es una propiedad de la luz de la que no nos ocuparemos aquí, pero *a grosso modo*, la podemos identificar como una medida de su capacidad para generar interferencia.

propiedades ópticas, no solo en agua sino en aire y en vacío<sup>6</sup>. También comenzó a analizarse la posibilidad de atrapar átomos, aunque eso es en sí mismo, otro tema de la física contemporánea<sup>7</sup>. Sin embargo, uno de los avances más importantes ocurrió en 1986, nuevamente debido a Ashkin y colaboradores (entre ellos Steven Chu, que fue premio Nobel de Física 1997 por sus contribuciones en el enfriamiento y captura de átomos con luz). Esta vez desarrollaron una trampa óptica muy estable, que permitía atrapar a una partícula en las tres dimensiones espaciales con un sólo haz de luz fuertemente enfocado [4]. Mas aún, el año siguiente sucedió a este equipo de trabajo otra serendipia. Al realizar un experimento para manipular cierto tipo de virus, observaron que algunos especímenes caían en la trampa óptica, se agitaban frenéticamente por unos momentos y luego quedaban inmóviles. Un análisis directo ante un microscopio confirmó sus sospechas: la muestra se había contaminado con bacterias que, al ser atrapadas, morían rápidamente a causa de la radiación absorbida<sup>8</sup>. Reemplazaron entonces el láser de luz verde que habían usado (0.514 micras de longitud de onda) por un láser infrarrojo (longitud de onda de 1.064 micras), cuya radiación no causa daño a la materia biológica debido a su baja absorción. Los resultados fueron extraordinarios; consiguieron atrapar organismos vivos como bacterias, levaduras y células de diversos tipos, pero además, las pudieron mantener en la trampa el tiempo suficiente como para observar reproducción celular sin sufrir daño aparente. Por otra parte, combinaron el sistema de enfocamiento del láser y el sistema de observación, hasta entonces independientes<sup>9</sup>, mediante un sólo objetivo de microscopio que cumplía ambas funciones simultáneamente, lo cual simplificó mucho el arreglo experimental [4]. Una vez atrapada, la partícula puede desplazarse con respecto a su entorno, ya sea moviendo el haz de luz o la muestra como un todo; en este caso se habla de *pinzas ópticas*. Una configuración experimental típica de pinzas ópticas se muestra en la figura 1a. Hoy en día se utilizan muchas configuraciones diferentes dependiendo de la aplicación, incluso se puede introducir el láser directamente a un microscopio óptico, lo cual es muy frecuente en aplicaciones biológicas.

¿Pero qué es lo que hace posible que una partícula sea atrapada con luz? El ingrediente clave que permite la captura óptica es que existan gradientes en la intensidad de la luz. Si bien la fuerza óptica sobre una partícula tiene dos contribuciones, una de ellas, llamada fuerza de esparcimiento, solo empuja a las partículas en la dirección de propagación de la luz. La que hace posible atrapar es una componente conservativa, conocida como fuerza dipolar o de gradiente. Para entender esto, hay que notar que la luz en la sección transversal de un láser se distribuye de manera que la intensidad es máxima en el centro y decae rápidamente hacia las orillas, lo que se conoce como haz *Gaussiano*. Si

---

<sup>6</sup>Resulta mucho más difícil atrapar micropartículas a bajas presiones, ya que el medio juega un papel estabilizador.

<sup>7</sup>Ver el capítulo "Materia ultrafría" de este libro.

<sup>8</sup>A esta muerte provocada por luz le llamaron *optocución*, en analogía con la electrocución.

<sup>9</sup>Las partículas se observaban lateralmente por la luz que esparcían.



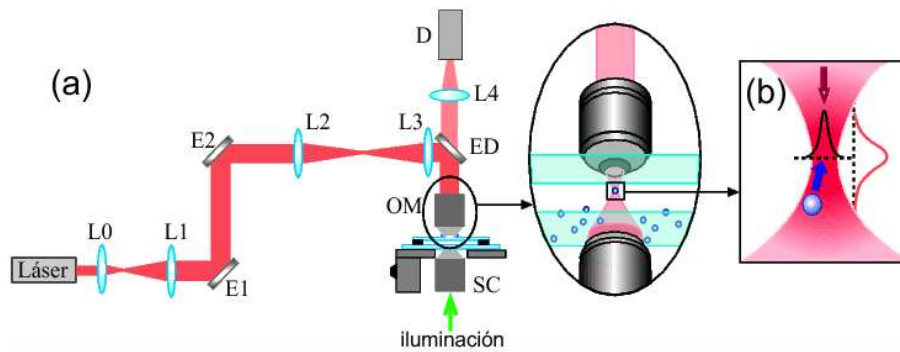


Figura 1: (a) Una posible configuración experimental de pinzas ópticas. El láser es dirigido con los espejos E1-E2 hasta un espejo dichroico ED, que sólo refleja la luz del láser. La muestra está en una base de traslación XYZ. El objetivo de microscopio OM enfoca el láser al mismo tiempo que forma la imagen de la muestra en el detector D (cámara), con ayuda del lente ocular L4. El sistema condensador SC provee la iluminación de fondo necesaria para ver las partículas. Las lentes L0-L1 expanden el haz láser si es necesario, mientras las lentes L2-L3 (opcionales) se usan para crear planos conjugados entre E2 y la abertura posterior del objetivo de microscopio, de modo que se puede mover el haz de luz sobre la muestra controlándolo mediante el espejo. (b) Esquema mostrando los gradientes de intensidad en un haz gaussiano enfocado y la dirección de la fuerza de gradiente (flecha azul).

este haz se enfoca fuertemente, se genera además un gradiente de intensidad en la dirección de propagación, con un máximo en el plano focal (ver figura 1b). Esto provoca que la magnitud de la fuerza óptica dependa de la posición del objeto con respecto a la distribución de luz. Aunque las fuerzas ópticas se pueden entender con base en el intercambio de momento lineal entre luz y materia, el origen fundamental de la interacción es eléctrico. Una partícula dieléctrica neutra en presencia de un campo eléctrico se polariza, ya que los centros de carga positiva y negativa se desplazan entre sí, induciendo un dipolo o campo eléctrico en el interior de la partícula, opuesto al campo externo. Si el campo externo no es uniforme, la partícula tenderá a ubicarse en una posición que minimice el campo total (externo más interno), pues así la energía de interacción del sistema también es mínima. Esta posición corresponde a un punto de equilibrio estable y depende de la polarizabilidad de la partícula en el medio, o en términos ópticos, de su índice de refracción con respecto al del medio. Lo anterior queda resumido en una expresión bastante simple para la fuerza de gradiente [4]:

$$\vec{F} = \frac{3Vn_m}{2c} \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \nabla I(\vec{r}), \quad (1)$$

donde  $V$  representa el volumen de la partícula,  $c$  la velocidad de la luz en vacío,  $I(\vec{r})$  la intensidad como función de la posición y  $n = n_p/n_m$  el índice de refracción relativo,

siendo  $n_m$  el índice del medio y  $n_p$  el de la partícula. Si  $n_p > n_m$ , como en el caso de una esfera de latex en agua, la fuerza gradiente conducirá a la partícula hacia las regiones de máxima intensidad. Por eso en las pinzas ópticas las partículas se atrapan en la región focal. La magnitud de la fuerza de gradiente es suficiente para equilibrar el peso de la partícula y la fuerza de esparcimiento. Por el contrario, si  $n_p < n_m$ , como sería el caso de una burbuja de aire en agua, la fuerza de gradiente se invierte en dirección, dando como resultado que la partícula trate de escapar de las regiones de máxima intensidad. Este tipo de objetos se pueden atrapar con distribuciones de luz en las que se alternen regiones de máxima intensidad con regiones oscuras. De hecho, el reto de atrapar partículas con diferentes propiedades ópticas (metálicas, absorbentes, birrefringentes, etcétera), así como la posibilidad de atrapar varias partículas simultáneamente, estimularon el uso de diferentes distribuciones de luz. Aunque los procesos físicos involucrados y su descripción depende de las propiedades del objeto, un resultado general es que las fuerzas ópticas son directamente proporcionales a la potencia total del haz de luz sobre la muestra. Si bien la potencia mínima necesaria para atrapar una partícula depende de su tamaño<sup>10</sup>, de sus propiedades y de las demás fuerzas involucradas en el sistema (como el peso y el arrastre hidrodinámico), generalmente unos cuantos miliwatts son suficientes. Las fuerzas generadas por la luz son del orden de piconewtons.

La posibilidad de generar diferentes configuraciones en la distribución espacial de la luz ha permitido desarrollar una gran versatilidad en las trampas ópticas modernas, dando un nuevo y magnífico potencial de aplicaciones [5]. Por ejemplo, por medio de interferencia es posible obtener distribuciones extendidas de franjas o patrones de luz con periodicidad en dos o tres dimensiones. Estas distribuciones periódicas son conocidas como *redes ópticas*, y permiten atrapar un gran número de partículas simultáneamente e incluso manipularlas controlando la fase de las ondas que interfieren. Las partículas se pueden atrapar ya sea en los máximos o en los mínimos de intensidad, dependiendo de su índice de refracción y de su tamaño relativo con respecto al periodo. Así se han desarrollado técnicas que ofrecen importantes aplicaciones prácticas, tales como la separación y organización de partículas dentro de una mezcla polidispersa [6].

Otra forma de moldear un haz de luz es utilizando hologramas generados por computadora (HGC). Los hologramas son básicamente rejillas de difracción que codifican la información necesaria para que la luz que las atraviesa (hologramas de transmisión) o que se refleja en ellas (hologramas de reflexión) sea modulada en amplitud y/o en fase y se redistribuya de acuerdo a una configuración deseada. Mas aún, en la actualidad existen unos dispositivos llamados moduladores espaciales de luz (MEL), que son pequeñas

---

<sup>10</sup>Para objetos de mayor tamaño la descripción teórica de la fuerza óptica es más compleja; ésta ya no resulta proporcional al volumen sino a la superficie de la partícula, lo que implica que para equilibrar el peso se necesitarían potencias cada vez más altas, y esto constituye un límite al tamaño de objetos que se pueden atrapar.

pantallas de cristal líquido (también las hay de transmisión y reflexión) que se controlan mediante una computadora y en las cuales se pueden desplegar los HGC, pero con la gran ventaja de que pueden reconfigurarse de manera interactiva. Esto se conoce como holografía dinámica, y cuando se usa para redistribuir la luz que llega a una trampa óptica, se habla de pinzas ópticas holográficas o micromanipulación dinámica [5, 7]. En la fila superior de la figura 2 se muestran simulaciones numéricas de algunas distribuciones de intensidad que se han utilizado para manipulación, mientras que en los cuadros inferiores se muestran imágenes de partículas atrapadas en tales distribuciones.

Finalmente, otra técnica de micromanipulación dinámica es mediante las llamadas *trampas de haz compartido* (beam sharing) [4, 5]. En este caso se utilizan moduladores acusto-ópticos, o bien espejos controlados por galvanómetros, que pueden desviar el haz de luz incidente y recorrer diferentes posiciones en una secuencia determinada que se repiten con frecuencias hasta del orden de decenas de kHz. En esta forma, el haz de luz *visita* una cierta posición varias veces por segundo y una partícula puede ser atrapada ahí (siempre que su tiempo de difusión sea mayor que el tiempo entre cada visita del haz). Así, varias partículas se atrapan de manera simultánea compartiendo el mismo haz de luz. Aunque las desviaciones angulares son pequeñas, la precisión y rapidez que se obtienen con este método lo convierten en la mejor opción para aplicaciones en biología donde se requiere más de una trampa, como en algunos estudios de motores moleculares [5].

Cuando se atrapan varias partículas simultáneamente hay un efecto de interacción entre ellas, mediada por la luz, que se ha llamado ‘enlace óptico’ [8], al margen de otros tipos de interacciones que puedan ocurrir por efectos térmicos e hidrodinámicos, cargas superficiales, interacción con la superficie, etcétera. Si el haz de luz utilizado en las pinzas ópticas tiene un diámetro de varias veces el tamaño de una partícula, es posible atrapar varias partículas al mismo tiempo en la sección transversal del haz, que en el caso de microesferas se distribuyen en una red hexagonal [8]. Por otra parte, más recientemente se observó que en una trampa de haces contra-propagantes (que no interfieren entre sí), se llegan a formar cadenas de partículas atrapadas a lo largo del eje común de propagación [5]. Éstas tienen su origen en las modificaciones de la distribución de luz incidente sobre cada partícula debido a la presencia de sus vecinas. Es decir, una partícula puede actuar como micro-lente y enfocar la luz que incide sobre ella, lo que sirve como trampa para una segunda partícula y viceversa. Incluso con un solo haz de luz en dirección vertical se ha observado también el apilamiento de partículas a lo largo del eje de propagación. Así, es posible distinguir entre el enlace óptico axial y transversal, pero ambos se deben a la interacción mutua entre partículas y con el campo luminoso. Aunque conceptualmente y de manera cualitativa el enlace óptico está entendido, su estudio cuantitativo es todavía un problema abierto en el que varios grupos se encuentran trabajando [5].

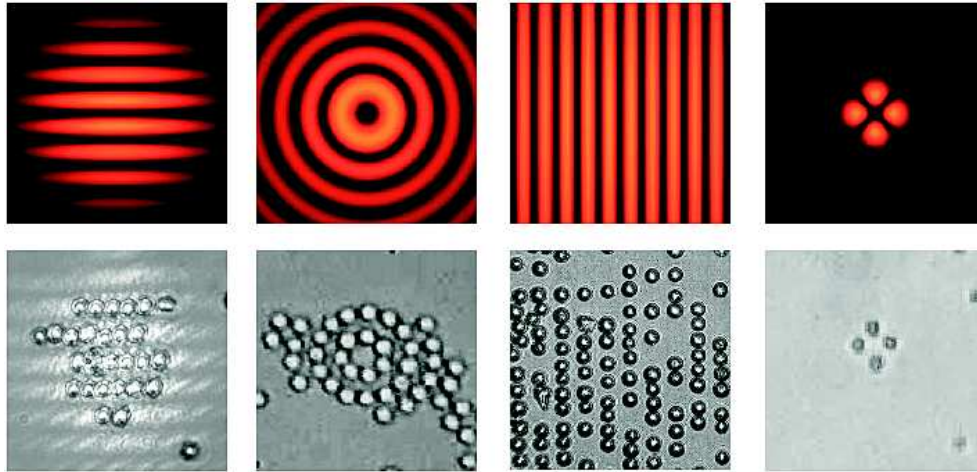


Figura 2: En la fila superior se muestran simulaciones de algunas distribuciones transversales de intensidad generadas con diferentes técnicas ópticas y en la fila inferior fotografías experimentales de su correspondiente aplicación en la captura óptica de micro-partículas. Las partículas se acomodan de acuerdo con la distribución de intensidad de cada haz.

Las técnicas de micromanipulación se pueden usar también como herramientas para investigaciones en otra áreas de la física. Por ejemplo, en física estadística las trampas ópticas han permitido hacer modelos experimentales de sistemas mecánicos estocásticos en condiciones controladas, que logran tanto confirmar predicciones teóricas como investigar nuevos fenómenos. Por mencionar algunos, en 2010 se logró medir la velocidad *instantánea* de una partícula browniana, lo que posibilita estudiar su movimiento en un régimen balístico y fuera de equilibrio, antes de alcanzar el régimen difusivo [9]. Para esto se usó una trampa de haces contra-propagantes en a una cámara con vacío parcial para atrapar una partícula en condiciones de baja presión. Al desviarse de su posición de equilibrio, la partícula defleca los haces de luz, de modo que su posición puede determinarse midiendo la deflección de uno de los haces como función del tiempo. Además, para medir directamente la velocidad, esta señal se dividió en dos, de tal forma que una mitad llega con un pequeño retraso respecto a la otra. Así, se pudo verificar que la distribución de velocidades instantáneas de la partícula satisface la estadística de Maxwell-Boltzmann. Mas aún, estos resultados constituyeron una verificación experimental del teorema de equipartición de la energía para una partícula Browniana.

Otro ejemplo es el estudio del escape inducido por ruido térmico de una partícula Browniana que se encuentra en un pozo de potencial, conocido como el problema de Kramers. Este tipo de estudios es importante por su relación con diferentes fenómenos físicos que involucran el escape de estados metaestables (como difusión en sólidos, doblamiento

de proteínas, la dinámica de una reacción química en presencia de un solvente) superando una barrera de potencial. La teoría de Kramers establece que la tasa de escape depende de la energía potencial y del coeficiente de difusión de la partícula, relacionando la probabilidad de que ocurra el escape con algunos parámetros experimentales. Para modelar esto, se usó un sistema de dos trampas ópticas contiguas que actuaban como pozos de potencial separados por una barrera. Aplicando la teoría de Kramers se logró obtener un mapa tridimensional de energía potencial de la doble trampa óptica, midiendo el tiempo de permanencia de la partícula en cada posición. Por otro lado, el mismo tipo de trampa biestable sirvió también para estudiar experimentalmente el fenómeno conocido como resonancia estocástica [4].

La micromanipulación óptica también se ha usado para la verificación experimental de modelos teóricos. Tal es el caso del modelo de rueda dentada (en inglés: ratchet), en la misma línea de investigación de sistemas de dinámica compleja, que permite dilucidar el mecanismo mediante el cual las proteínas motoras transportan vesículas en el interior de las células eucariontes, además de que ha encontrado también aplicaciones en el estudio del transporte y segregación en medios fluidos y granulados [10]. Éste consiste en estudiar la dinámica de un objeto inmerso en una región espacial con variaciones periódicas de energía potencial, que a su vez son moduladas en el tiempo por otra función periódica, pero alguno de los dos, ya sea el potencial espacial o la función de modulación temporal, exhibe algún tipo de asimetría (de ahí el nombre de rueda dentada). La fuerza neta aplicada al sistema tiene promedio temporal cero, y sin embargo, debido a la asimetría, bajo ciertas condiciones es posible activar un movimiento del objeto en una dirección preferencial. Las condiciones necesarias para activar este transporte dependen de varios factores: las características del potencial espacial, la función de modulación temporal, las propiedades del objeto que se estudia y su interacción con el medio en el que se encuentra (si el objeto se encuentra o no en un régimen sobre-amortiguado, o bien, si el sistema es estocástico o determinista). Las posibilidades que ofrecen las trampas ópticas para estudiar diferentes variantes del modelo de rueda dentada son extremadamente versátiles [4, 11].

Por otra parte, dentro de la propia óptica, la micromanipulación ha permitido explorar las propiedades dinámicas de ciertos tipos de haces de luz, como aquellos que son portadores de momento angular, además del momento lineal, y por tanto son capaces de provocar torcas sobre la materia [5, 7, 12]. Un caso relativamente conocido es el de la luz circularmente polarizada, que puede provocar una torca sobre objetos birrefringentes<sup>11</sup>, atribuida a la transferencia de espín de los fotones. Pero también hay haces de luz que tienen una fase rotante y frentes de onda helicoidales (como sacacorchos); son portadores de *momento angular orbital*. Su intensidad es nula en el eje de rotación y generalmente tienen

---

<sup>11</sup>Esto fue demostrado por primera vez por Richard A. Beth en 1936 en un experimento extraordinario a escala macroscópica.

una distribución de intensidad transversal formada por uno o varios anillos concéntricos (ver figura 2). Entre éstos están los llamados haces Laguerre-Gaussianos y haces Bessel; ambos pueden provocar la rotación de micro-partículas orbitando con respecto al centro del haz, en contraste con la rotación provocada por luz con polarización circular, que siempre es con respecto a un eje interno de la partícula. Estos efectos, junto con otros mecanismos de rotación controlada basados en la rotación de distribuciones de intensidad por interferencia, holografía dinámica o trampas de haz compartido, son candidatos viables para manejar elementos de micro-máquinas [7, 12]. Incluso hay ya micro-rotores que operan con base en presión de radiación asimétrica (como en un molino) o por transferencia de espín, y se han usado como bombas en sistemas LOC (lab en un chip) y para hacer estudios de microreología [7].

Otra área donde las pinzas de luz también tienen una incidencia muy importante es en la física de coloides y materia blanda. Por ejemplo, para estudiar interacciones hidrodinámicas, o electrostáticas en el caso de coloides cargados, procesos de cristalización y transiciones de fase, crecimiento de monocapas, etcétera [5]. En fin, así como los anteriores, existen innumerables ejemplos de sistemas físicos que se han podido investigar gracias a la micromanipulación óptica. De hecho, algunas de sus aplicaciones más excitantes están relacionadas con el estudio de sistemas biológicos [4, 13], como se discutirá en la sección 4. La intención aquí ha sido únicamente dar una idea de la riqueza de esta herramienta y las posibilidades que ofrece.

Para finalizar esta sección, no se puede dejar de mencionar una nueva herramienta de micromanipulación que se desarrolló durante la primera década del nuevo siglo: las pinzas plasmónicas, basadas en la generación de plasmones de superficie [14]. Los plasmones de superficie son ondas que se generan en medios cargados eléctricamente (plasma); la oscilación colectiva de las cargas se propaga como lo hace una onda en la superficie del agua. En el caso de los plasmones, la fuente que excita la perturbación es un campo óptico *evanescente*, es decir, ondas de luz que se propagan a lo largo de una superficie en la que ha ocurrido reflexión total interna (RTI), *confinadas* muy cerca de ésta, ya que su amplitud decrece exponencialmente al alejarse de ella. Si la superficie en la que ocurre RTI está recubierta por una fina capa de metal, el campo eléctrico de la onda evanescente provocará la oscilación de los electrones de conducción en la superficie o, en otras palabras, excitará plasmones de superficie, lo que resulta en una amplificación del campo. Esto sólo ocurre si el campo eléctrico incidente tiene una componente paralela a la dirección de propagación de la onda evanescente, lo que corresponde a una polarización tipo p (campo eléctrico paralelo al plano de incidencia), también denotada como TM (transversal magnética).

Así, el campo evanescente (en el caso de que no exista recubrimiento metálico) o el campo generado por los plasmones, pueden atraer partículas neutras hacia la superficie,



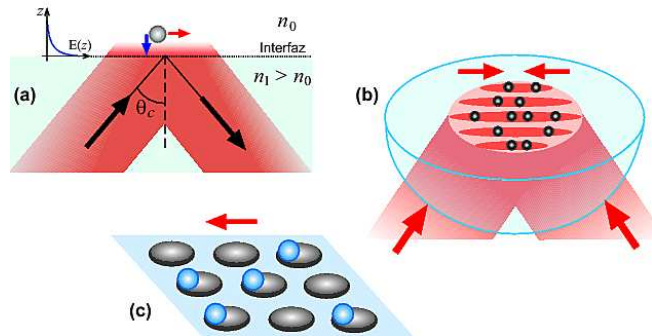


Figura 3: (a) La flecha azul indica la dirección de la fuerza de gradiente sobre la partícula mientras que la roja indica la dirección de la fuerza de esparcimiento (presión de radiación) ejercidas por la onda evanescente en la superficie. La curva en el lado izquierdo ilustra el gradiente de intensidad de la onda evanescente. (b) Configuración de luz incidente estructurada y haces contra-propagantes en una trampa con ondas evanescentes. (c) Ejemplo de confinamiento tridimensional usando parches metálicos en una superficie para generar plasmones localizados.

donde la intensidad es mayor, y empujarlas en la dirección de propagación de la onda superficial (figura 3a). El confinamiento con plasmones es mucho mayor que el que se puede obtener con ondas evanescentes por la amplificación del campo eléctrico. De este modo las partículas pueden ser guiadas a lo largo de la superficie, pero no están confinadas. Para lograr atraparlas, se pueden usar ondas evanescentes contra-propagantes con una estructura de franjas de interferencia en la dirección perpendicular a la propagación de las ondas superficiales [6], como se ilustra en la figura 3b, o bien con otro tipo de distribución de intensidad que facilite el confinamiento. Pero con los plasmones se puede llegar aun más lejos, al generar *plasmones localizados*. Esto es, si en lugar de una capa metálica homogénea se imprimen en la superficie algunos *parches* de metal con formas determinadas, el campo eléctrico de los plasmones quedará confinado en las tres dimensiones espaciales, muy cerca del parche, y así se obtiene la captura tridimensional de partículas [14] (figura 3c). Cabe mencionar que la geometría *planar* del confinamiento por onda evanescente o por plasmones, tiene la ventaja de que se puede incorporar más fácilmente a sistemas integrados del tipo LOC, y el haz de luz que se utiliza en estos casos no necesita estar focalizado. Inicialmente se pensó que este mecanismo permitiría atrapar partículas nanométricas, por el hecho de que el gradiente de intensidad se localiza en una región mucho más pequeña que la que se puede generar enfocando una onda de luz propagante. Sin embargo, se encontró que los efectos térmicos debidos al calentamiento del medio causado por los plasmones afectan mucho más a los objetos nanométricos, impidiendo su captura, pero condujeron exitosamente a una nueva área: la termoplasmónica. Aún así, estas investigaciones continúan su curso como un tema de frontera; recientemente por fin se han logrado atrapar objetos nanométricos con nanoantenas plasmónicas, que se forman

con la combinación adecuada de dos o más elementos metálicos [14].

### 3. Retos y avances en las técnicas de detección

Retomemos por un momento la conferencia “There’s plenty of room at the bottom”. Feynman señaló la necesidad de mejorar el microscopio electrónico, que en ese momento era la mejor herramienta disponible para *ver* a escalas microscópicas. El mensaje más importante es que no basta con *hacer* objetos pequeños, ni siquiera con poder *manipularlos*; para que esto tenga sentido también es necesario *observarlos* con suficiente detalle. La buena noticia es que este llamado fue atendido, no únicamente para el microscopio electrónico, que tiene algunas limitaciones respecto al tipo y preparación de las muestras a observar, sino para una miríada de técnicas de microscopía que pueden aplicarse casi a cualquier tipo de objeto, y en particular a muestras biológicas. Aquí concentraremos la atención en algunas de las técnicas ópticas, que han evolucionado dramáticamente en las últimas décadas.

Si bien hoy contamos con herramientas de imagen con una resolución que permite incluso detectar átomos individuales, cerca del 80 % de la investigación en el área de ciencias biológicas se sigue realizando con técnicas de microscopía óptica, debido a que las células son relativamente transparentes en la región óptica del espectro [15] (luz visible e infrarrojo (IR) cercano). De hecho, hay técnicas ópticas muy bien establecidas para visualizar objetos transparentes, que no trataremos aquí, como la microscopía de contraste de fase o la interferometría de contraste diferencial, también conocida como microscopía de Nomarski. Pero lo que hace tan valiosos los métodos ópticos de imagen en el campo de la biología es que resultan *no-invasivos*, en el sentido de que causan daños mínimos o nulos a las muestras estudiadas, permitiendo incluso el estudio de muestras *in vivo*. Sin embargo, una de las limitaciones históricas de la microscopía óptica había sido el llamado *límite de difracción*, es decir, la imposibilidad de discernir dos puntos que se encuentren más próximos entre sí que aproximadamente la mitad de la longitud de onda de la luz utilizada, lo cual fue señalado por Ernst Abbe desde 1873. De hecho, el diámetro FWHM<sup>12</sup> del mínimo *spot* al que se puede focalizar una onda de luz propagante, de acuerdo con la condición de Abbe, es [16]  $\Delta r \sim \lambda / (2n \sin \alpha)$  en el plano focal y  $\Delta z \sim \lambda / (n \sin^2 \alpha)$  a lo largo del eje óptico, donde  $\lambda$ ,  $\alpha$  y  $n$  denotan, respectivamente, la longitud de onda, el ángulo de apertura de la lente y el índice de refracción del medio en que se encuentra la muestra. Estas resoluciones no son suficientes para acceder a los constituyentes celulares, como organelos, proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, cuya estructura y/o función son las interrogantes que desea contestar la biología moderna.

---

<sup>12</sup>Acrónimo de Full Width Half Maximum, que indica un criterio para considerar el ancho de una función que exhibe un máximo principal



El reto de la microscopía óptica es, de alguna forma, vencer el límite de difracción en términos de resolución espacial. Nos avocaremos entonces a los avances que se han hecho en esta dirección en las últimas décadas. Se trata de técnicas de *superresolución* y básicamente se pueden separar en dos tipos, que pueden utilizarse de manera combinada [17]. El primero es conocido como microscopía óptica de barrido en campo cercano (NSOM o SNOM por sus siglas en inglés: near-field scanning optical microscopy), y el segundo, por contraste, es conocido como microscopía de superresolución en campo lejano.

La NSOM forma parte de un grupo de técnicas orientadas al análisis de superficies: la microscopía de pruebas por barrido (SPM, scanning probe microscopy). A este grupo pertenecen, por ejemplo, el microscopio de barrido y tunelamiento (STM), el microscopio de fuerza atómica (AFM), el de fuerza magnética (MFM), el de fuerza química (CFM), entre otros [18]. Sin embargo, a diferencia de éstos, que permiten principalmente obtener detalles topográficos, la NSOM presenta algunas ventajas asociadas con la información que se puede obtener por medios ópticos, como datos espectroscópicos, datos con resolución temporal, alto contraste, características relacionadas con la polarización, imágenes de fluorescencia, etcétera. Por otra parte, aunque la NSOM no alcanza una resolución espacial tan elevada como otros instrumentos de la familia de SPM, supera por un orden de magnitud el límite de difracción de las imágenes ópticas convencionales, y se puede utilizar en condiciones menos demandantes en cuanto a la preparación de la muestra.

La idea de vencer el límite de difracción utilizando la luz en campo cercano se le ocurrió a Edward Synge en 1928, pero en ese entonces no había la tecnología para llevarla a la práctica. El principio físico es muy simple. El campo óptico inmediatamente posterior a una pequeña abertura en una pantalla opaca está constituido por ondas propagantes y evanescentes, pero el campo evanescente decae exponencialmente con la distancia, y por lo tanto, la luz transmitida aun a distancias del orden de la longitud de onda, ya es sólo propagante y será muy afectada por la difracción. Específicamente, considerando una abertura circular de radio  $a < \lambda$ , la luz en campo cercano permanece prácticamente colimada dentro de una distancia  $d$  tal que  $(d/a) \ll 1$ . Así, al iluminar una muestra con esta abertura, la resolución en campo cercano estará únicamente limitada por el tamaño de la abertura, y no por la longitud de onda de la luz [19]. El contraste en la imagen se obtiene, por ejemplo, por variaciones en índice de refracción, estructura química, estrés local, absorción, fluorescencia, etcétera. Por supuesto, para examinar una muestra con este principio es necesario, además de una abertura de semejantes dimensiones, poder recorrer la muestra para ir formando una imagen bidimensional extendida. Fue hasta 1984 cuando un grupo dirigido por Dieter Phol logró aplicar estos principios en la región óptica del espectro, aunque los primeros instrumentos funcionales aparecieron después de 1992, cuando la tecnología de barrido ya se había desarrollado (trasladores piezoeléctricos y mecanismos de retroalimentación para mantener la punta a una distancia fija de la superficie). El mayor reto tecnológico en el NSOM sigue siendo la abertura, que en la mayoría de los instrumentos actuales consiste en una fibra óptica monomodo que termina en

una punta con forma de cono truncado. Alrededor de la abertura se deposita un recubrimiento metálico, que hace las veces de la pantalla opaca. Recientemente se han utilizado también puntas muy finas de metal, que incluyen las llamadas nano-antenas, y hay grupos investigando la posibilidad de aumentar el confinamiento y la intensidad de la señal colectada excitando plasmones de superficie.

Hay diferentes configuraciones de NSOM. En el modo de iluminación la punta se usa para iluminar mientras que la luz transmitida a través de la muestra se colecta en campo lejano mediante un objetivo de microscopio de alta apertura numérica. Otra posibilidad es iluminar con condiciones de campo lejano y usar la punta para colectar la luz transmitida (modo colección). Si la muestra es opaca se puede usar la misma punta para iluminar y colectar la señal reflejada (modo de abertura compartida). Finalmente, en algunos arreglos se usa la punta para colectar una onda propagante como resultado de frustrar una onda evanescente producida en la muestra por RTI, pero este instrumento es conocido mas bien como microscopio de tunelamiento fotónico. La NSOM se ha usado para realizar estudios biológicos de detección de una sola molécula, incluyendo experimentos de difusión en una interfaz que revelan aspectos novedosos de la dinámica celular, así como para investigar la membrana de células y proteínas. Para esto se puede combinar la NSOM con espectroscopía Raman o microscopía de fluorescencia. Aunque la NSOM *per se* no requiere características especiales de la muestra a analizar, su desventaja principal es que sólo puede utilizarse para la inspección de superficies. Cabe mencionar que en la última década se están desarrollando estrategias de superresolución en campo cercano basadas en el uso de *super-lentes* con base en la *refracción negativa*, pero esto aún está lejos de convertirse en instrumentos prácticos [19].

En cuanto a las técnicas de superresolución de campo lejano, aplicadas para obtener imágenes de volumen, hay dos objetivos: incrementar la resolución axial (disminuir  $\Delta z$ ) y la resolución transversal o lateral (disminuir  $\Delta r$ ); y la consecución de cada uno de ellos es independiente del otro. Hasta la década de los 90, las estrategias ópticas que habían logrado mejorar la resolución en  $z$  eran la microscopía confocal y la de fluorescencia multifotónica. La primera se basa en usar fuentes puntuales tanto para la iluminación como para la detección (utilizando *pinholes*), lo cual permite capturar únicamente la luz proveniente del plano focal y reduce así  $\Delta z$  en un factor de aproximadamente  $\sqrt{2}$ . En la segunda, se utilizan dos (o más) fotones que se absorben simultáneamente para excitar un fluoróforo unido al espécimen de interés; al ser un efecto no-lineal, esto ocurre sólo en la región de máxima intensidad, es decir en el plano focal. Sin embargo, los dos fotones tienen una frecuencia de la mitad de la necesaria para excitar al fluoróforo, se trata de luz IR, y por tanto, no produce una mejora sustancial en la resolución en términos de  $\lambda$ .

Un avance más significativo se hizo a mediados de los 90 por el grupo de Stefan Hell, con el microscopio  $4\pi$  (o simplemente  $4\text{Pi}$ ) [16, 20]. La idea es generar un frente de onda lo más cercano posible a una esfera o, en otras palabras, aumentar la recolección de las frecuencias espaciales más altas en el espectro de Fourier de la imagen, que contienen la información de los detalles más finos del objeto. Para esto Hell propuso aumentar

la apertura numérica del sistema usando dos objetivos yuxtapuestos a ambos lados del espécimen, para expandir la abertura del ángulo sólido (el nombre 4Pi viene del ángulo sólido de una esfera completa). No hay distinción entre iluminación y colección de luz en esta configuración, de hecho, se utiliza luz láser y los frentes de onda producidos se suman de manera coherente en un punto focal común, cuya dimensión en eje es  $\Delta z \sim \lambda/3n$ , incluso menor que  $\Delta r$ . Pero aún en las versiones más recientes de estos instrumentos se logra como máximo un ángulo de apertura de  $\alpha \approx 74^\circ$ , que todavía dista bastante del ideal de  $90^\circ$ , y el precio a pagar por esto es que el spot focal exhibe dos lóbulos, arriba y abajo del plano focal, que deterioran la imagen. Para minimizar este efecto, una alternativa es utilizar además excitación de dos fotones o una configuración confocal, y las contribuciones remanentes de los lóbulos (si las hay) se remueven al procesar la imagen. Con el microscopio 4Pi se han obtenido imágenes tridimensionales de células con resolución axial de entre 80 y 150nm.

Otras técnicas similares, que se usan con iluminación de campo extendido, son las de imágenes por interferencia (denotadas genéricamente como  $I^n M$ ), que también consisten en el acoplamiento de dos objetivos opuestos para producir interferencia de la iluminación coherente [20]. En los sistemas  $I^2 M$  se obtiene una señal de fluorescencia a través de los dos objetivos y, cuidando que ambas señales hayan recorrido trayectorias ópticas idénticas, se recombinan en el detector. La interferencia de las señales produce un patrón característico del que se extrae información con alta resolución axial. El plano focal se va moviendo para obtener una serie de imágenes a lo largo de  $z$ . En la técnica  $I^3 M$  se genera un patrón de ondas estacionarias en  $z$ , y se obtiene directamente una serie de imágenes en distintos planos  $z$ , correspondientes a los antinodos. Por utilizar iluminación de campo extendido, éstas son más rápidas que la de 4Pi, pero esta última requiere menor procesamiento de los datos extraídos, además de que la onda estacionaria se degrada en la interacción con tejido grueso. En cualquier caso, ninguna de las anteriores representó mejoría en cuanto a la resolución lateral.

Por otro lado, los dispositivos de superresolución de campo lejano que han logrado incrementar la resolución lateral se pueden clasificar en dos grupos, ambos basados en el uso de marcadores fluorescentes, por lo que se conocen también como técnicas de superresolución funcional [17, 20]. Mas aún, un requisito fundamental para todas ellas es que las transiciones fluorescentes sean *reversibles*, ya que se recurre a una modulación temporal de la transición entre dos estados moleculares de un fluoróforo. Aunque hay muchas variantes, para no extender innecesariamente la discusión, sólo detallaremos en un ejemplo de cada grupo.

Dentro del primer grupo tomaremos como ejemplo el método de ‘Desactivación por Emisión Estimulada’ (STED: stimulated emission depletion) [16]. El común denominador de estas técnicas es que, además de modular temporalmente las transiciones fluorescentes, se modulan espacialmente usando iluminación estructurada. El principio de STED, también introducido por Stefan Hell, consiste en iluminar la muestra con un spot (limitado por difracción) que provoca la transición a un estado excitado B (‘brillante’) de todos

los marcadores fluorescentes dentro del área en que la intensidad de la luz de excitación supera un valor umbral. Inmediatamente después, se ilumina la muestra con un haz en forma de dona (como un Laguerre-Gaussiano), con un nodo de intensidad en el centro. Éste provoca el decaimiento por emisión estimulada (desactivación) de los marcadores de la periferia al estado A ('oscuro'), dejando en el estado B solo aquellos que se encuentran muy próximos al nodo central. Así se consigue un spot brillante con resolución lateral muy por debajo del límite de difracción (figura 4). Para inducir las transiciones se usan dos láseres pulsados sincronizados, con duración de pulsos entre 10 y 300 ps, siendo menor la duración del pulso de excitación. El láser de desactivación se conoce como haz STED y su longitud de onda está ligeramente desplazada hacia el rojo. La formación de la imagen se obtiene realizando un barrido sobre la muestra, repitiendo el procedimiento, por eso es importante que las transiciones sean reversibles. Pero para que este mecanismo sea posible, es necesario tener en cuenta los tiempos de vida de las moléculas fluorescentes en los estados A y B, así como la intensidad necesaria para inducir las transiciones.

Cuando una molécula fluorescente es iluminada para fotoactivar su transición de un estado A a uno B, la probabilidad de que permanezca en A decrece exponencialmente al incrementar la intensidad de la luz de excitación. La *intensidad de saturación*,  $I_s$ , es el umbral mínimo para inducir la transición en un número suficiente de moléculas (por ejemplo, cuando al menos el 50 % pasan de A a B). A medida que la intensidad incidente incrementa por sobre el valor de  $I_s$ , también lo hace la probabilidad de que una mayor cantidad de moléculas efectúen la transición. Por supuesto, lo mismo aplica para la transición inversa de B a A. Entonces, ambos láseres deben tener intensidades superiores a  $I_s$ , siendo más crucial la intensidad del láser de STED, puesto que ésta determina el tamaño de la región final iluminada mediante la siguiente relación [16]:

$$\Delta r = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + (I_{max}/I_s)}}, \quad (2)$$

donde  $I_{max}$  denota el máximo de la distribución de intensidad del laser de STED. Nótese que, en principio, el tamaño del spot se puede reducir tanto como se desee aumentando el valor de  $I_{max}$ ; si  $I_{max} = 0$  la Ec. 2 corresponde al límite de difracción de Abbe. La longitud de onda y duración del pulso STED se escogen de acuerdo al máximo de emisión y la  $I_s$  del fluoróforo utilizado. A las intensidades del láser STED (a menudo mayores que  $250 MW/cm^2$ ), los fluoróforos son desactivados de manera prácticamente instantánea y la emisión de fluorescencia se registra con un fotomultiplicador [20].

Las técnicas que comparten principios similares al STED han sido generalizadas bajo el acrónimo de RESOLFT (reversible saturable (or switchable) optical fluorescence transitions) [16, 17, 20]. Las diferencias entre ellas recaen en las estructuras específicas de la iluminación, en el uso de diferentes tipos de fluoróforos<sup>13</sup> y en algunos aspectos prácticos

<sup>13</sup>Hay fluoróforos con intensidades de saturación considerablemente menores que otros.

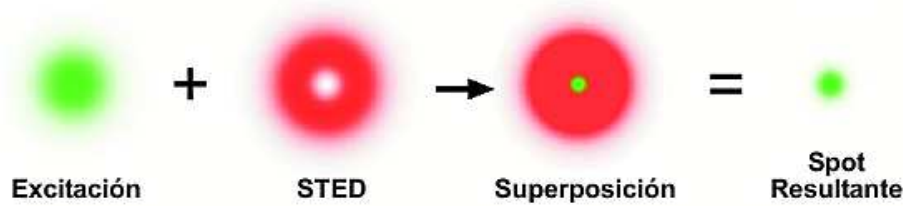


Figura 4: Modulación espacial de la iluminación en el proceso de STED. El láser de excitación (verde) induce la transición de los fluoróforos a un estado excitado, y posteriormente el láser STED (rojo) desactiva la transición alrededor del nodo central. Aunque ambos láseres están limitados en difracción, se obtienen resoluciones laterales de hasta 20nm (spot final). Es decir, se logran señales con superresolución manipulando la fase (en el haz de STED), el ancho de pulso y la intensidad de ambos lasers.

como la necesidad de escanear la muestra o no. Por ejemplo, se pueden usar distribuciones de luz con múltiples nodos y un detector extendido, siempre y cuando los nodos estén espaciados entre sí una distancia mayor que el límite de difracción, lo que permite un proceso de captura en paralelo en distintos puntos. Otros sistemas RESOLFT son el iso-STED, que es una versión 3D del STED acoplada a un sistema 4Pi; el GSD (ground state depletion), que requiere intensidades considerablemente menores que el STED; el SPEM (saturated pattern excitation microscopy) y el SSIM (saturated structured-illumination microscopy). Las dos últimas tienen el esquema inverso, es decir, se desactiva el estado oscuro mediante una excitación saturada y se obtienen imágenes de puntos negros sobre un fondo brillante.

El segundo grupo de técnicas de superresolución funcionales se basa en la detección de moléculas individuales mediante un proceso estocástico de activación y desactivación sucesiva del estado fluorescente [16, 17, 20]. En un instante dado, se activa el estado fluorescente en una serie de moléculas individuales distribuidas en una muestra y separadas entre sí por distancias mayores que los límites de resolución de Abbe, posteriormente estas moléculas vuelven al estado oscuro y se activa una nueva serie. Las posiciones de las moléculas son aleatorias, y para cada serie las moléculas activadas se pueden localizar con gran precisión ubicando el centroide de la señal luminosa. Así, en dos instantes diferentes pueden haberse activado moléculas que están separadas por una distancia mucho menor que el límite de Abbe, pero la diferente coordenada temporal permitirá localizar a cada una de ellas por separado. La localización de cada molécula fluorescente con precisión a escala nanométrica se hace mediante un conteo de fotones de fluorescencia con detectores de alta sensibilidad. Para lograr la activación de tan sólo unos cuantos marcadores en cada serie se usa un láser de muy baja potencia. Después de obtener la imagen de una serie los marcadores se desactivan por saturación, o bien, se destruyen por efecto fotoquímico

mediante sobreexposición, y entonces se activa una nueva serie. Entre estas técnicas se encuentran los esquemas de PALM y F-PALM (fluorescence photoactivation localization microscopy), STORM (stochastic optical reconstruction microscopy), PAINT (point accumulation for imaging in nanoscale topography), GSDIM (ground state depletion followed by individual molecule return), entre otros. Todos ellos han sido recientemente agrupados bajo el acrónimo de SMACM (single-molecule active control microscopy) [17]. Aunque la resolución lateral se incrementa notablemente en los sistemas SMACM, la resolución axial sigue siendo un reto. Recientemente se han ideado métodos basados en el uso de elementos astigmáticos para introducir una deformación en la imagen que depende del plano axial, también hay otros basados en imágenes generadas por interferencia (iPALM), en configuraciones tipo  $I^n M$  [20].

En resumen, es claro que hay una gran cantidad y diversidad de técnicas de detección e imagen, y este campo continúa creciendo y evolucionando, no sólo con el perfeccionamiento de los instrumentos, sino con el desarrollo de nuevas ideas. Sin embargo, pese a los avances y retos en materia de superresolución, no hay que desestimar las técnicas tradicionales, como la microscopía de campo brillante, cuyas imágenes actualmente se pueden mejorar mucho con la ayuda de software y que siguen siendo las de mayor rapidez de adquisición. Además, éstas ofrecen un campo de visión extendido que es muy útil para la identificación de rasgos generales de una muestra. Asimismo, los sistemas tradicionales de microscopía de fluorescencia, absorción multifotónica, contraste de fase, etcétera, siguen manteniendo su lugar privilegiado mientras las nuevas técnicas se desarrollan y se convierten en instrumentos prácticos. De hecho, para seleccionar una técnica de imagen en biología, hay varios aspectos a considerar, que dependen siempre del tipo de muestra y proceso a investigar. Por ejemplo, para aplicaciones con células vivas y procesos dinámicos, los aspectos principales a tener en cuenta son: la resolución, la sensibilidad de detección, la rapidez de adquisición y la viabilidad del espécimen. Esta última se refiere a mantener la muestra en condiciones adecuadas para garantizar su *salud*, así como a limitar el daño que le pueda ocurrir debido al proceso de imagen. En la mayoría de los casos, no basta con un solo tipo de microscopio, y es necesario combinar más de una técnica, evaluando los pros y contras de las diferentes opciones [15].

Aquí nos avocamos únicamente a la superresolución, pero cabe mencionar que las técnicas de imagen médica y biológica también han evolucionado en escalas macroscópicas, como la tomografía de coherencia óptica (OCT, optical coherence tomography). En la figura 5 se muestra un resumen de algunas técnicas y su escala de resolución. En la red existe una gran riqueza de recursos para ver ejemplos de imágenes obtenidas con diferentes métodos [20–22].



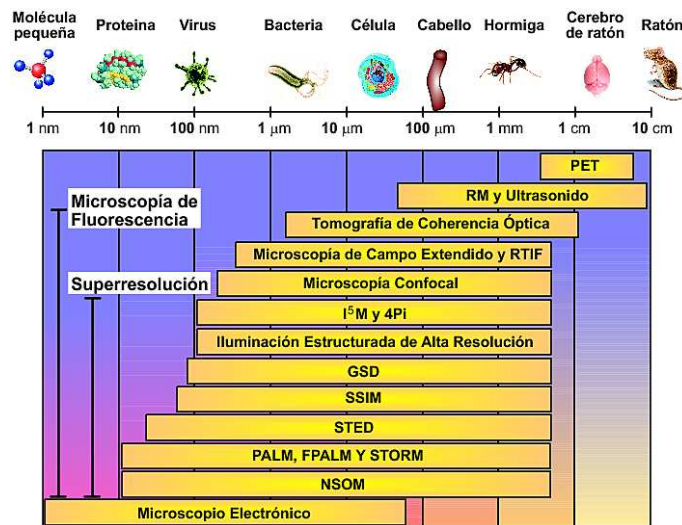


Figura 5: Esquema de la escala en la que se utilizan algunas técnicas de imagen (tomada de la referencia [20]). PET y MRI indican tomografía por emisión de positrones y resonancia magnética nuclear, respectivamente, para las demás abreviaturas referirse al texto.

#### 4. Investigación multidisciplinaria y sistemas integrados

En las secciones anteriores se construyó una visión general de los tres aspectos principales involucrados en la miniaturización: fabricación, manipulación y detección a escalas micro y nanométricas, ahora veremos como se pueden integrar en un contexto multidisciplinario. Aunque aquí nos enfocamos en técnicas que hacen uso de la luz como su principal herramienta, no hay que olvidar que hay otras herramientas igualmente importantes, como el uso de campos acústicos, eléctricos, magnéticos, efectos termodinámicos e hidrodinámicos, etcétera.

Cuando se demostró la micromanipulación de muestras biológicas *in vivo* con un láser IR, se abrieron nuevas y excitantes oportunidades de investigación en disciplinas como biología celular y molecular, biotecnología, biofísica, bioquímica e incluso en medicina. Por ejemplo, la captura óptica ha permitido caracterizar propiedades mecánicas de sistemas biológicos, como la elasticidad de células, componentes celulares y biomoléculas aisladas, como el ARN y el ADN, y entender su influencia en los aspectos funcionales.

Hasta hace un par de décadas, los estudios de biología molecular se basaban en análisis de volumen, es decir, en los datos obtenidos a partir de una colección de un enorme número de moléculas. Esto daba valores promedio para los parámetros estudiados, que realmente no permitían poner a prueba los modelos teóricos. En cambio, los estudios de una sola molécula han revolucionado esta área [4, 23]. Como prueba de ello, la manipulación directa y estiramiento de moléculas de ADN ha contribuido a entender sus inter-

acciones mecánicas con proteínas y enzimas, además de que permiten probar modelos teóricos que sirven también para otro tipo de materiales poliméricos. Los experimentos con micromanipulación óptica también han revelado la existencia de formas helicoidales adicionales del ADN estabilizadas por fuerzas y torcas, y han permitido entender las bases mecánicas de las interacciones entre el ADN y la maquinaria molecular involucrada en la transcripción, replicación y recombinación [23]. Adicionalmente, los ingenieros han tomado lecciones de la naturaleza; el entender el funcionamiento de la maquinaria biológica a nivel molecular ha servido de inspiración para impulsar el diseño y desarrollo de sofisticadas nanomáquinas utilizando los mismos principios.

Una manera de estirar el ADN es adherir uno de los extremos de la molécula (previamente marcada con un fluoróforo) a una microesfera de látex que es atrapada con pinzas ópticas. Posteriormente se utiliza la fuerza hidrodinámica de un fluido para estirar la molécula [13]. Otra posibilidad es adherir los dos extremos de la molécula a microesferas que son confinadas en trampas contiguas; una de ellas permanece fija mientras la otra se mueve de manera controlada.

Otro ejemplo impresionante es el estudio de los procesos de transporte por motores moleculares, como la cinesina o la miosina, que utilizan la energía liberada en algunas reacciones químicas en el interior de la célula (como la hidrólisis del ATP) para realizar trabajo mecánico. La molécula de cinesina, encargada del transporte de cromosomas a través del citoplasma, se compone de dos cadenas pesadas entrelazadas, lo que le da una forma alargada, y uno de sus extremos funciona como un par de “piernas” con las que recorre su camino a lo largo de filamentos proteicos llamados microtúbulos. Para estudiar su dinámica, un extremo de la cinesina se adhiere a una esfera transparente atrapada con luz, y conforme se empieza a desplazar a lo largo del microtúbulo, arrastra consigo a la esfera. Midiendo el desplazamiento de la esfera respecto a su posición de equilibrio en la trampa óptica se logra caracterizar el movimiento de la cinesina [13].

A nivel celular, se han estirado glóbulos rojos, cuyas propiedades de elasticidad no solo están relacionadas con su estado de maduración, sino también con la presencia de algunos padecimientos. Si bien estas investigaciones se pueden realizar utilizando micropipetas, la micromanipulación óptica ofrece la ventaja de poderse combinar fácilmente con otras técnicas, como espectroscopía Raman<sup>14</sup>, que permite monitorear los cambios químicos a medida que la célula se somete a un esfuerzo externo o durante el proceso de administración de una droga. También se ha combinado el uso de las pinzas ópticas con lo que se conoce como bisturí o escalpelo óptico, que consiste básicamente en enviar un pulso corto y controlado de luz láser de muy alta energía, usualmente de longitud de onda ultravioleta. Así se ha realizado fertilización in vitro, *taladrando* un agujero en la zona pelúcida de un óvulo con gran precisión, para facilitar la llegada del espermatozoide, el cual a su vez es llevado hasta el óvulo utilizando pinzas ópticas [13].

Para realizar mediciones de elasticidad, las pinzas ópticas deben ser adaptadas como

---

<sup>14</sup>Esta combinación ya ha recibido incluso un nombre propio: las pinzas Raman.



micro-transductores mediante un cuidadoso procedimiento de calibración. Cerca de la posición de equilibrio de la trampa, la fuerza óptica de gradiente se puede modelar por la ley de Hooke,  $F = -Kx$ , de modo que para calibrarla hay que determinar la constante de restitución de la trampa  $K$  midiendo el desplazamiento  $x$  de una partícula atrapada cuando se somete a una fuerza conocida (por ejemplo, la fuerza de arrastre ejercida por un flujo constante). Para medir desplazamientos generalmente se utiliza un láser auxiliar, aunque también se puede utilizar el mismo de la pinza. Cualquier desviación de la partícula de su posición de equilibrio provocará una desviación correspondiente de la luz difractada, que se colecta en un fotodiodo de cuadrante. Estos dispositivos tienen un arreglo de cuatro detectores en forma de cuadrantes; cada uno de ellos integra la luz que le llega produciendo una señal eléctrica. La magnitud relativa de las cuatro señales está en correlación directa con el cambio de posición de la partícula, que puede caracterizarse con precisión de nanómetros.

Sin embargo, estas configuraciones experimentales de las pinzas ópticas no son compatibles con la geometría planar de un chip o de un dispositivo compacto en general. Por esta razón, con el propósito de integrar las pinzas a sistemas LOC se han ideado otras configuraciones que sí satisfacen tales requisitos. Quizás la más simple es una trampa de haces contra-propagantes, pero introduciendo la luz a través de fibras ópticas. Por otro lado, las trampas ópticas también se pueden introducir como mecanismos de control en circuitos microfluídicos. Éstos son microcanales integrados sobre un sustrato, a manera de chip, por los que circulan volúmenes muy pequeños de fluido, del orden de microlitros a femtolitros. Estos dispositivos son ideales para el desarrollo de la tecnología LOC, ya que permiten tareas como el transporte ordenado, análisis en paralelo, clasificación y separación de componentes biológicos como células, bacterias y proteínas. Aquí las trampas ópticas pueden usarse para controlar elementos integrados a los chips como microbombas, microválvulas, microtamices, etcétera. [6]. De hecho, la combinación de la óptica con la microfluídica ha sido tan exitosa que dio lugar a lo que hoy se llama optofluídica. La termoplasmónica también se puede integrar en estos dispositivos para elevar localmente la temperatura del fluido o de las partículas que circulan en él, como parte de un análisis o tratamiento.

Un objetivo general en el desarrollo de sistemas LOC es conseguir dispositivos que permitan un análisis rápido y poco invasivo de fluidos biológicos complejos con el propósito de realizar diagnósticos y monitorear terapias *in situ* [24]. Pese a que ya hay muchas piezas del rompecabezas, aún es mucho lo que falta por hacer, especialmente en materia de integrar todos los elementos necesarios en dispositivos compactos y portátiles. Esta es un área de investigación abierta, que ofrece enormes posibilidades y es inminentemente multidisciplinaria.

Hay gran cantidad de retos abiertos, que no solo involucra a físicos, químicos y biólogos, sino a especialistas en diversas áreas, como desarrollo de software y algoritmos matemáticos y/o numéricos para el procesamiento de datos, investigación de materiales, instrumentación y diseño, etcétera. Esto hace necesario contar con personas capaces de

entender diferentes *lenguajes científicos* y jugar el importantísimo papel de traductores, así como también aportar su conocimiento más integral para ubicar problemas relevantes que se pueden abordar desde una perspectiva multidisciplinaria. Mientras en otros países hace ya varias décadas que se incluyen carreras con un perfil multidisciplinario, México ha dado los primeros pasos en esa dirección hace relativamente poco tiempo, pero ya con algunos ejemplos exitosos. De hecho, resulta muy alentador atestiguar que, cada vez más, las nuevas generaciones tienen interés por el enfoque multidisciplinario de la ciencia.

## 5. Referencias

- [1] [http://inventors.about.com/od/istartinventions/a/intergrated\\_circuit.htm](http://inventors.about.com/od/istartinventions/a/intergrated_circuit.htm).
- [2] N. Maluf and K. Williams, *Introduction to microelectromechanical systems engineering*. Artech house publishers, 2004.
- [3] A. Ostendorf and B. Chinkov, "Two-photon polymerization: A new approach to micromachining-femtosecond lasers enable microfabrication with resolution beyond the diffraction limit." *Photonics spectra*, vol. 40, no. 10, pp. 72–81, 2006.
- [4] A. Ashkin, *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers: a reprint volume with commentaries*. World Scientific, 2006.
- [5] K. Dholakia and T. Čižmár, "Shaping the future of manipulation," *Nature Photonics*, vol. 5, no. 6, pp. 335–342, 2011.
- [6] A. Jonáš and P. Zemánek, "Light at work: the use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis," *Electrophoresis*, vol. 29, no. 24, pp. 4813–4851, 2009.
- [7] M. Padgett and R. Bowman, "Tweezers with a twist," *Nature Photonics*, vol. 5, no. 6, pp. 343–348, 2011.
- [8] M. Burns, J. Fournier, J. Golovchenko *et al.*, "Optical matter: crystallization and binding in intense optical fields." *Science (New York, NY)*, vol. 249, no. 4970, p. 749, 1990.
- [9] T. Li, S. Kheifets, D. Medellin, and M. Raizen, "Measurement of the instantaneous velocity of a brownian particle," *Science*, vol. 328, no. 5986, pp. 1673–1675, 2010.
- [10] P. Reimann, "Brownian motors: noisy transport far from equilibrium," *Physics Reports*, vol. 361, no. 2, pp. 57–265, 2002.
- [11] A. Arzola, K. Volke-Sepúlveda, and J. Mateos, "Experimental control of transport and current reversals in a deterministic optical rocking ratchet," *Physical review letters*, vol. 106, no. 16, p. 168104, 2011.

- [12] H. Rubinsztein-Dunlop and M. Freise, "Light-driven micromachines," *Optics and Photonics News*, vol. 13, no. 4, pp. 22–26, 2002.
- [13] P. Prasad, *Introduction to biophotonics*. Wiley-Interscience, 2003.
- [14] M. Juan, M. Righini, and R. Quidant, "Plasmon nano-optical tweezers," *Nature Photonics*, vol. 5, no. 6, pp. 349–356, 2011.
- [15] D. Stephens and V. Allan, "Light microscopy techniques for live cell imaging," *Science Signalling*, vol. 300, no. 5616, p. 82, 2003.
- [16] S. Hell, "Far-field optical nanoscopy," *Science*, vol. 316, pp. 1153–1158, 2007.
- [17] R. Won, "Interview to W. E. Moerner: Eyes on super-resolution," *Nature Photonics*, vol. 3, pp. 368–369, 2009.
- [18] [Http://www.uksaf.org/tech/spm.html](http://www.uksaf.org/tech/spm.html).
- [19] R. Dunn, "Near-field scanning optical microscopy," *Chemical reviews*, vol. 99, pp. 2891–2928, 1999.
- [20] <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/suprerresolution/index.html>.
- [21] <http://www.microscopyu.com>.
- [22] <http://www.olympusmicro.com/primer/>.
- [23] C. Bustamante, Z. Bryant, S. Smith *et al.*, "Ten years of tension: single-molecule dna mechanics," *Nature*, pp. 423–426, 2003.
- [24] H. Craighead, "Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 387–393, 2006.