

TEMAS 29

INVESTIGACION
CIENCIA

Edición española de **SCIENTIFIC AMERICAN**

A través del microscopio

0.0.0.2.9

9 778411 355668

3er trimestre 2002

6,50 EURO





Sumario

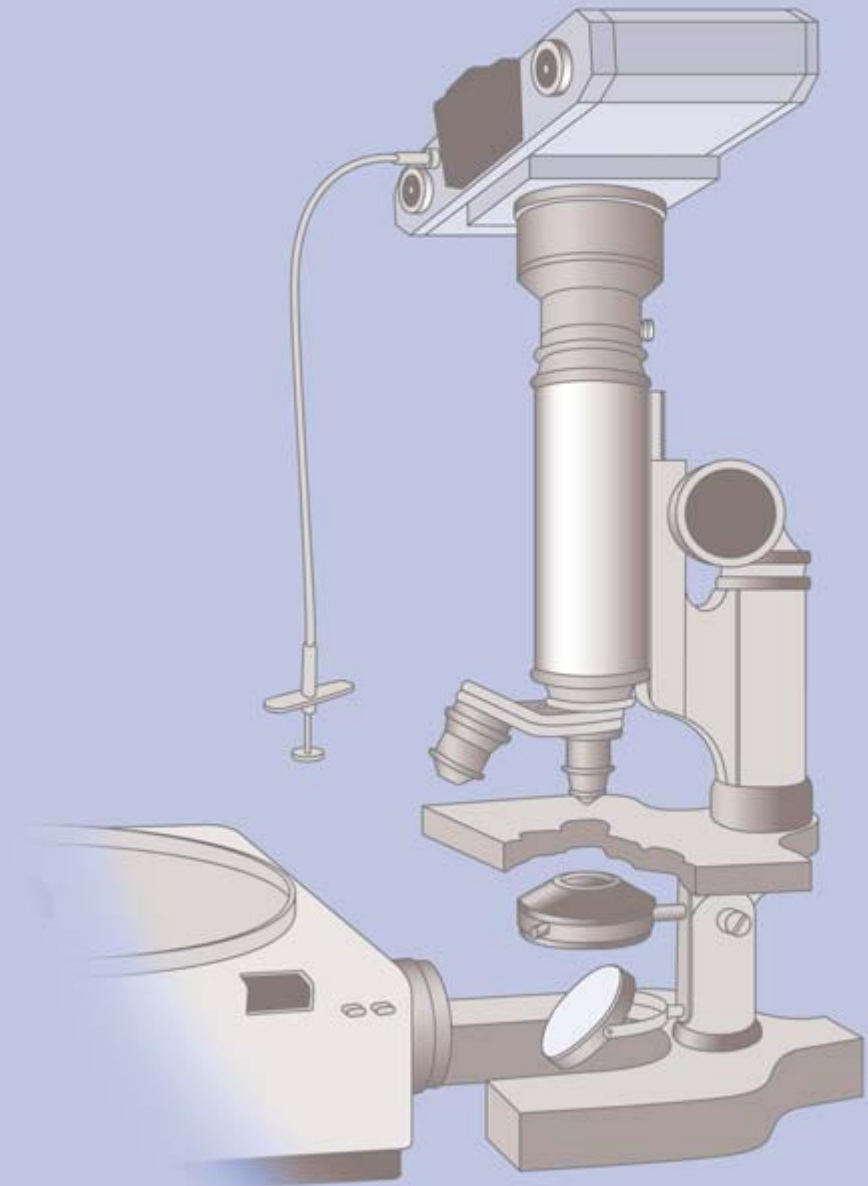
I. TÉCNICAS

- 4 El microscopio acústico**
Calvin F. Quate
- 14 Microscopios con sonda de barrido**
H. Kumar Wickramasinghe
- 24 El microscopio de efecto túnel**
Gerd Binnig y Heinrich Rohrer
- 32 Microscopía confocal**
Jeff W. Lichtman
- 38 Microscopios de rayos X**
Malcolm R. Howells, Janos Kirz y David Sayre
- 46 La física de superficies**
Rodolfo Miranda
- 56 Técnicas de microfotografía**
Jearl Walker

II. OBSERVACIONES

- 64 Camillo Golgi y la reacción negra**
Paolo Mazzarello
- 72 Cajal y la estructura histológica del sistema nervioso**
José M. López Piñero
- 80 Las primeras observaciones**
Brian J. Ford
- 84 Representación visual de embriones humanos**
Bradley R. Smith
- 90 Aplicaciones biológicas del microscopio de fuerzas**
Carlos Bustamante y Ricardo García

TECNICAS



El microscopio acústico

Este instrumento es hoy un medio de trabajo común en distintas especialidades científicas y actividades industriales. En este artículo de 1979 uno de sus creadores explicaba los fundamentos en que se basa

Calvin F. Quate

Las ondas sonoras que vibran en la atmósfera con frecuencias inferiores a unos 20.000 hertz (oscilaciones por segundo) nos son familiares como medio de comunicación. Por ejemplo, las oscilaciones de la voz humana pertenecen a este grupo. La atmósfera no constituye un medio favorable para la propagación de ondas acústicas de frecuencias más elevadas, ultrasónicas. Estas vibraciones inaudibles se disipan rápidamente en gases tales como el aire. Las ondas de los ultrasonidos pueden propagarse a distancias apreciables con moderada atenuación sólo en líquidos y sólidos. Las ondas acústicas que vibran en esos medios condensados a frecuencias ultrasónicas se emplean para la formación de imágenes y no para la comunicación. Existen dispositivos ultrasónicos basados en la producción y detección de ondas acústicas con frecuencias del orden del megahertz (un millón de oscilaciones por segundo). Se emplean frecuentemente en el estudio de objetos submarinos y en averiguar características estructurales internas de los órganos del cuerpo humano y de materiales. Por ejemplo, un feto en el seno de una mujer preñada puede ser examinado de este modo con completa inocuidad.

El microscopio acústico constituye una extensión de la tecnología de formación ultrasónica de imágenes. Sus ondas ultrasónicas tienen frecuencias próximas a un gigahertz (mil millones de oscilaciones por segundo), cerca de mil veces mayores que las frecuencias típicas de los sistemas macroscópicos de formación ultrasónica de imágenes. En términos de las longitudes de onda la comparación es ilustrativa. Se miden en metros las

longitudes de onda de los sonidos producidos por la voz humana, en milímetros las de los ultrasonidos empleados en los dispositivos macroscópicos de formación de imágenes y en micrometros las de la mayoría de los microscopios acústicos perfeccionados. Es decir, las ondas empleadas en estos nuevos dispositivos de formación de imágenes son de longitud comparable con la de las ondas electromagnéticas de la luz visible.

No hay que sorprenderse, por tanto, de que el microscopio acústico empiece a proporcionar imágenes con una resolución que no desdice de la que tienen las imágenes conseguidas con el microscopio óptico ordinario. Lo que puede resultar extraño es que los que trabajan en este campo se esfuerzan, no en igualar la resolución del microscopio óptico, sino en rebasarla. Pero no se trata solamente de la resolución. El origen del contraste en los sistemas acústicos es completamente distinto del de los ópticos. Ciertas propiedades, hasta ahora inaccesibles, de los objetos microscópicos empiezan a entrar en consideración en las imágenes acústicas. Se confía en que el microscopio acústico encontrará su lugar al lado del microscopio óptico, el microscopio electrónico y el futuro microscopio de rayos X, formando una línea de dispositivos complementarios para explorar el mundo de las cosas muy pequeñas.

S. Y. Sokolov, de la Unión Soviética, tuvo en el decenio de 1920 la idea de utilizar ondas acústicas del orden de los gigahertz en un sistema de microscopía. Pero la tecnología necesaria para producir tales ondas no estuvo disponible hasta comienzos del decenio de 1960. Gran parte de los primeros trabajos sobre dispositivos

ultrasónicos de muy alta frecuencia fueron realizados por Hans E. Bömmel y Klaus Dransfeld en los Laboratorios Bell. A finales de ese decenio, James S. Imai e Isadore Rudnick, de la Universidad de California en Los Angeles, se las ingeniaron para producir en helio líquido ondas acústicas de una longitud de onda de sólo 0,2 micrometros.

Ahora, a finales del decenio de 1970, varios grupos, con técnicas algo diferentes, están empeñados en la tarea de intentar desarrollar un sistema práctico de microscopía acústica. En las primeras fases del esfuerzo tuvieron un papel destacado los investigadores de la Zenith Radio Corporation, dirigidos por Adrianus Korpel y Lawrence W. Kessler. (Este último ha pasado a la Sonoscan, Inc., que fabrica una versión de barrido con láser del microscopio acústico.) Nuestro grupo de la Universidad de Stanford ha perseguido el objetivo activamente durante cinco años. Hemos conseguido reducir la longitud de onda operativa en nuestro dispositivo de cinco micrometros a medio micrometro.

Mientras tanto, ¿qué es lo que hemos descubierto? Hemos aprendido que un microscopio acústico puede construirse con un elemento focalizador más simple que el constituido por las lentes del microscopio óptico ordinario. Hemos encontrado que la resolución de un microscopio acústico sólo está limitada por la longitud de onda con la que opera y que las aberraciones no desempeñan un papel importante. Hemos demostrado que los detalles en las micrografías acústicas pueden ser tan finos como en las micrografías ópticas. Hemos confirmado que es fácil medir el espe-

sor de películas de semiconductores y metales con las ondas acústicas y que, por tanto, es posible estudiar la adhesión de tales películas a un sustrato. En el caso de muestras biológicas, hemos conseguido imágenes con un elevado contraste de varios tejidos sin necesidad de una tinción previa. Confiamos en que esta cualidad

del microscopio acústico permitirá que pronto pueda emplearse para lograr nueva información de las células vivas.

¿Cómo se forman las imágenes en un microscopio acústico? Al igual que en el microscopio óptico, la base reside en el cambio de la velocidad de propagación de las ondas al atrave-

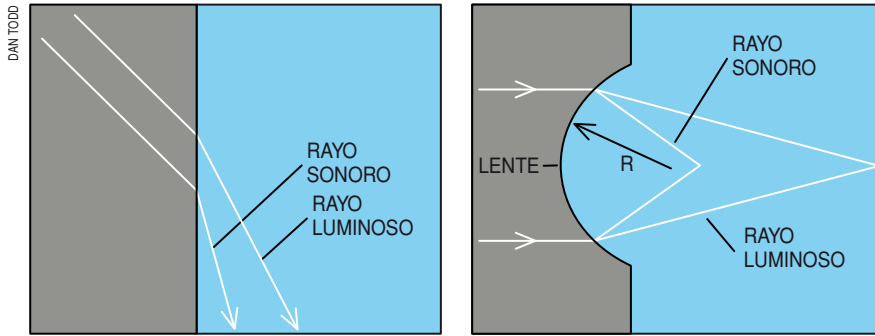
sar la superficie de separación existente entre dos medios materiales distintos. En las ondas acústicas este cambio es mucho mayor que el que presentan las ondas luminosas. El índice de refracción, que mide las velocidades relativas de la luz entre dos medios, nunca es mayor de 1,9 y usualmente no vale más de 1,5. Por



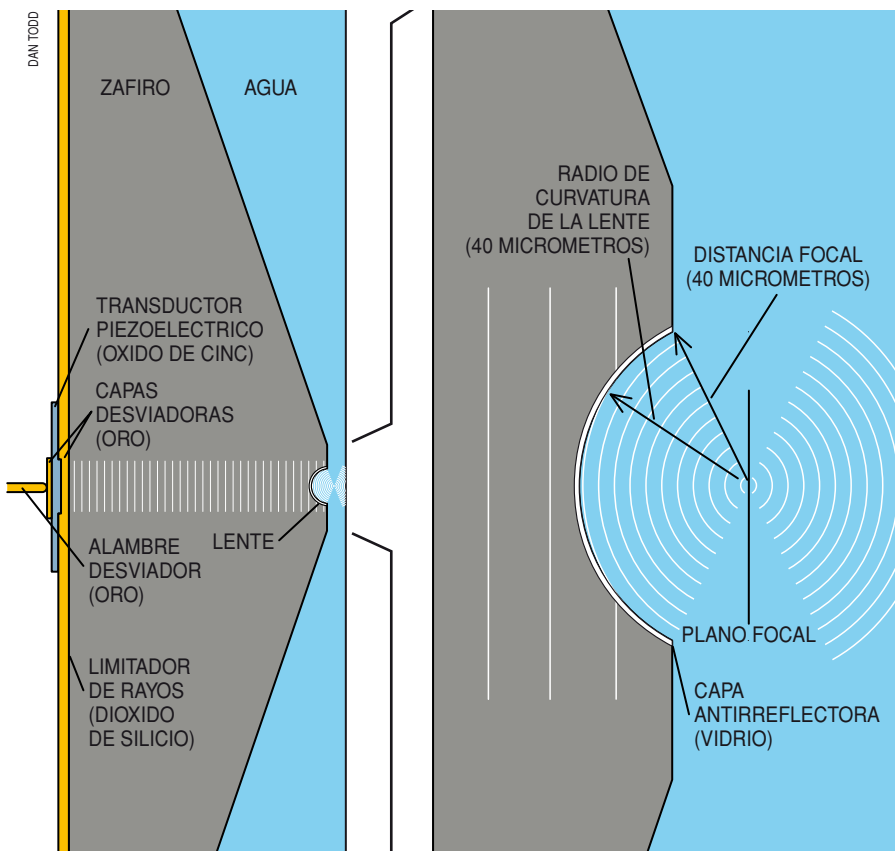
DANIEL RUGAR, UNIVERSIDAD DE STANFORD

1. MICROGRAFIA ACUSTICA de un conjunto de cromosomas humanos, obtenida por el autor y sus colaboradores, en el departamento de física aplicada de la Universidad de Stanford, como prueba del grado de resolución alcanzado por el nuevo dispositivo ultrasónico de formación de imágenes. Con este fin, tanto el portaobjetos con la muestra como la lente del instrumento estaban sumergidos en argón líquido. Se mantenían a una temperatura de 85 grados kelvin (menos 188 grados Celsius) rodeando el recipiente que contenía el argón líquido de un baño con nitrógeno líquido. Se analizaron electrónicamente

las señales ultrasonoras registradas para obtener la imagen de los cromosomas en una pantalla de televisor. Las líneas verticales que aparecen en la fotografía obedecen a defectos en el proceso de barrido. El frotis de cromosomas fue preparado en el laboratorio de Howard M. Cann en la facultad de medicina de la Universidad de Stanford. Se eliminó el recubrimiento de proteína de los cromosomas y fueron teñidos de la forma habitual para poner de manifiesto en las micrografías ópticas su estructura en bandas. El aumento es de 3500 diámetros.



2. TANTO LOS RAYOS SONOROS COMO LOS RAYOS LUMINOSOS se refractan, o desvían, al atravesar la superficie de separación entre materiales en los que las velocidades de propagación de las ondas son distintas. El ángulo de desviación es mucho mayor en los rayos sonoros (*diagrama de la izquierda*). La presencia de una concavidad esférica en el material de mayor índice de refracción (esto es, en el que las ondas se propagan más deprisa) servirá para localizar ambas clases de rayos (*diagrama de la derecha*). En esta situación, los rayos sonoros convergen más rápidamente que los rayos luminosos y en consecuencia la aberración resultante en la imagen obtenida es menor. Para las ondas sonoras, la distancia focal es 1,3 veces mayor que el radio de curvatura de la lente (*simbolizado con la letra R*). Para los rayos luminosos, la distancia focal es unas tres veces mayor que el radio de curvatura de la lente.



3. LENTE ACUSTICA diseñada por el grupo del autor en Stanford. Consiste en una superficie cóncava y esférica de separación entre zafiro y agua formada en la punta biselada de una corta varilla de unos 6 milímetros de diámetro (*izquierda*). La película piezoeléctrica que se encuentra depositada en la superficie posterior de la lente de zafiro convierte las señales eléctricas en otras acústicas durante el proceso de formación de la imagen. La misma película sirve a continuación para convertir las señales acústicas en señales eléctricas en la fase siguiente de lectura. La parte ampliada de la derecha muestra el perfil aproximado del haz de ultrasonidos localizado en el agua. Las líneas blancas paralelas en ambos esquemas ilustrativos son los frentes de onda acústicos. La superficie lisa de la varilla de zafiro se ha hecho rugosa para dispersar las ondas espurias. Además, se aplica usualmente un elemento antirreflector de vidrio a la superficie frontal de la lente al objeto de reducir las reflexiones acústicas internas.

el contrario, la velocidad de las ondas sonoras puede cambiar en un factor diez al atravesar una interfaz (superficie de separación) sólido-líquido adecuada.

El elemento focalizador primario del microscopio acústico, desarrollado por nuestro grupo en Stanford, consiste en una interfaz esférica cóncava, de unos 40 micrometros de radio, formada entre zafiro y agua. En tal superficie de separación los rayos sonoros se desvían fuertemente hacia dentro al entrar en el líquido. En nuestro sistema todos los rayos convergen en un estrecho “embudo” próximo al centro de curvatura de la esfera. En dicha interfaz el cambio en la velocidad de la luz sería pequeño y el ángulo de convergencia del haz localizado sólo sería ligero. La aberración resultante debería eliminarse recurriendo a sistemas de lentes con múltiples superficies refringentes.

En el caso acústico, una lente esférica con una única superficie refringente resulta casi la hipótesis ideal. La fuerte convergencia hace que la aberración sea mínima. Además, el recubrimiento antirreflector, semejante al comúnmente empleado en las lentes ópticas, puede aplicarse al zafiro para reducir la reflexión de las ondas acústicas en la interfaz. Sin embargo, las reflexiones residuales no pueden eliminarse completamente y constituyen una pequeña fuente de interferencia. Por fortuna, podemos distinguir las diferentes reflexiones con ayuda de una señal de prueba formada por un pulso momentáneo de ultrasonido. La parte del pulso que viaja a través del líquido se reflejará a partir del objeto y llegará al receptor más tarde que la parte reflejada por la lente. Este procedimiento permite identificar la causa de las ondas reflejadas, pues quedan registradas en distintos momentos.

Las principales componentes del sistema acústico son bastante simples, si se comparan con el prodigioso despliegue de equipo electrónico necesario para producir las señales y prepararlas para conseguir la imagen final. Se ha diseñado nuestro sistema de modo que podamos llevar las señales hacia dentro y hacia fuera de la celda acústica tan pronto como sea posible. La razón de esta manera de proceder reside simplemente en que, en la actualidad, las señales eléctricas son más fáciles de manipular que las acústicas.

El primer paso en el proceso de la obtención de la imagen consiste en convertir una señal eléctrica en otra