



GRADO EN FÍSICA

**COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE RESOLUCION
ÓPTICA: DE LOS LÍMITES CLÁSICOS A LA
SUPERRESOLUCIÓN STED**

Presentado por:

PABLO QUILES PÉREZ

Dirigido por:

ALEJANDRO CALABUIG BARROSO

CURSO ACADÉMICO 2024-2025

Índice

1. Abstract	3
2. Introducción	4
3. Objetivos	6
4. Marco teórico	7
4.1. La luz como perturbación electromagnética	7
4.2. Óptica geométrica	8
4.2.1. Creación de imágenes	8
4.2.2. Aproximación paraxial	9
4.3. Resolución	9
4.3.1. Límite clásico de la difracción	10
4.3.2. Límite de Rayleigh	13
4.3.3. Full Width at Half Maximum	13
4.4. Aberraciones Geométricas	15
4.5. Óptica de difracción	18
4.5.1. Teorema integral Kirchoff	19
4.5.2. Aproximación del campo lejano	19
4.6. Fluorescencia	20
5. Metodologías	23
5.1. Método de superresolución STED	23
5.2. Montaje	32
5.3. Realización	34
5.3.1. Lenguaje de la simulación: Python	34
5.3.2. Cálculo de la PSF	34
5.3.3. PSF del límite de Abbe	35
5.3.4. Haz STED	36

5.3.5. Utilización de aberraciones	37
5.3.6. Tipos de haces	38
5.3.7. El problema de photobleaching	38
6. Resultados	39
6.1. ¿Porqué el límite de Abbe termina en 200 nm?	39
6.2. Corrección de aberraciones	40
6.3. Haz de depleción STED	42
6.4. PSF confocal vs PSF STED	44
6.5. Haz CW vs pulsado	45
6.6. Problema del photobleaching	46
7. Conclusiones	48
7.1. Conclusiones del trabajo	48
7.2. Implicación con los ODS	49
8. Anexos	54
8.1. Librerías básicas necesarias	54
8.2. Comparación PSF (gráfica)	54
8.3. Funciones de Bessel 1er y 2ndo tipo	57
8.3.1. Cálculo de los valores de Bessel	59
8.4. Lambdas	60
8.5. STED	65
8.6. Aberraciones con máscara	66
8.7. Aberración con lente esférica	72
8.8. CW vs pulsed	75
8.9. Photobleaching	77

Abstract

Este trabajo analiza y compara la resolución óptica en microscopios convencionales, con la técnica de superresolución STED (Stimulated Emission Depletion). Mientras que los microscopios tradicionales están limitados por la difracción, STED emplea óptica no lineal para superar este límite y lograr una mayor resolución. Se revisan los fundamentos teóricos del límite clásico de resolución y el principio de funcionamiento de STED, destacando sus ventajas y limitaciones. Además, se realiza un análisis comparativo basado en simulaciones computacionales para ilustrar la diferencia en resolución entre ambas técnicas. Para el correcto estudio de ambas técnicas, se deberán revisar sistemas ópticos y las irregularidades que pueden acarrear, como por ejemplo aberraciones.

Palabras clave: limite de difracción, superresolución, STED, aberraciones

This paper analyzes and compares the optical resolution in conventional microscopes with the super-resolution technique STED (Stimulated Emission Depletion). While traditional microscopes are diffraction limited, STED employs nonlinear optics to overcome this limit and achieve higher resolution. The theoretical underpinnings of the classical resolution limit and the principle of operation of STED are reviewed, highlighting its advantages and limitations. In addition, a comparative analysis based on computational simulations is performed to illustrate the difference in resolution between the two techniques. For the correct study of both techniques, optical systems and the irregularities they may entail, such as aberrations, should be reviewed.

Keywords: diffraction limit, super-resolution, STED, aberrations

Introducción

En la microbiología se utilizan microscopios confocales, los cuales quedan muy limitados debido a que se trabajan en escalas muy pequeñas como podría ser ~ 200 nm. En cambio, la utilización de técnicas de superresolución permiten que las imágenes de los microscopios puedan tener una mejor calidad y por tanto facilitar el estudio de las muestras.

La superresolución ha ayudado en las técnicas de los microscopios para mejorar la calidad de las imágenes, superando así el límite de Abbe. Gracias a esta nueva rama de técnicas de superresolución, podemos observar las moléculas de nuestra muestra individualmente interaccionando entre ellas de manera dinámica, en vez de visualizarlas en perturbaciones de conjuntos como hacen las técnicas de resolución convencionales (Galbraith y Galbraith, 2011). Las técnicas de superresolución han conseguido una mejora de $\times 1.4$ en la resolución de las muestras (Valli et al., 2021), lo que supone un gran avance para el mundo de la biología molecular.

Gracias a técnicas como STED, se puede llegar a superar esa barrera haciendo así que las muestras biológicas puedan ser estudiadas con más detalle.

En la figura (1) podemos ver una comparativa de la diferencia de calidad de imagen que permite un microscopio confocal (imagen a) y la que nos otorga al aplicarle la técnica STED (imagen b).

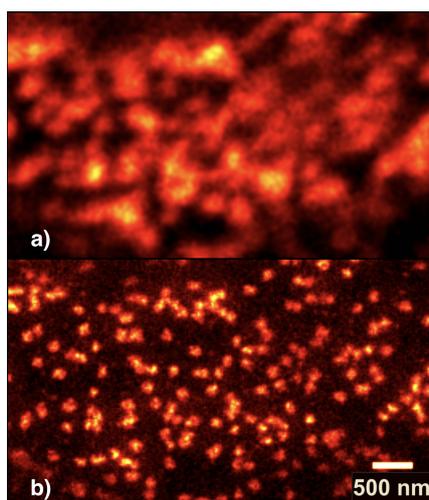


Figura 1: a) podemos observar una muestra de una proteína del complejo de poros nucleares bajo un microscopio tradicional, la cual se ve borrosa y no se puede distinguir bien. En cambio, la imagen b) nos muestra la misma imagen con mucha mejor calidad, dada por un microscopio con la técnica de superresolución STED (Universität Münster – Medizin, s.f.)

Claramente se ve una notable mejoría. Debido a esto, se reconoce que el estudio de la ruptura del límite de resolución clásico (límite de Abbe (11)) es fundamental para la correcta visualización y estudio de muestras, en este caso de células.

El objetivo de este proyecto será entender las bases de la resolución clásica y la superresolución mediante el método STED. Para ellos nos basaremos en comparativas de las PSF (Point Spread Function) y cómo se comporta en la técnica STED al variar intensidad.

En este trabajo se tendrá en cuenta las aberraciones geométricas que sufren los sistemas ópticos y cómo solucionarlos.

En el estudio de los sistemas ópticos, para poder explicar el modelo de una manera sencilla y simplificada, se necesita recurrir a ciertas aproximaciones, tanto del sistema como de la onda que interacciona con él. Explicaremos el teorema de Kirchoff, el cual estudia la luz cuando se encuentra con una abertura. Este teorema nos conducirá a la aproximación de campo lejano. También cabe destacar la aportación de la aproximación paraxial.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo será la comparación del sistema óptico y sus limitaciones físicas, y la técnica de superresolución ya comentada anteriormente, la técnica STED. Con ello se pretende demostrar en qué aspectos es mejor cada tipo de sistema óptico. Para ello nos haremos preguntas sobre cómo se llega a superar y mejorar un límite que se creía imposible de atravesar. Hablaremos también de si la técnica STED solo mejora lo existente o, en su defecto, genera nuevas fallas en los sistemas.

Para el correcto desarrollo y experimentación de esta técnica, se tendrá que estudiar cómo se comportan los sistemas ópticos, ya que la técnica STED es utilizada en microscopios. Se estudiarán tanto aberraciones que puedan aparecer, como aproximaciones que se hacen en la mayoría de sistemas.

Marco teórico

La luz como perturbación electromagnética

Definimos la luz como una onda electromagnética que se propaga por el vacío, es decir, no necesita un medio para propagarse. Tanto el campo magnético como el eléctrico son perpendiculares entre sí y entre la dirección de propagación. Dichos campos cumplen las ecuaciones de Maxwell.

$$\begin{array}{ll}
 \nabla \cdot \mathbf{E} = \frac{\rho}{\varepsilon_0} & \nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \\
 \nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} & \nabla \times \mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{J} + \mu_0 \varepsilon_0 \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t}
 \end{array}$$

Cuando no existen cargas externas ($\rho = 0$) ni corriente ($\mathbf{J} = 0$), hay dos ecuaciones que se reducen.

$$\begin{array}{l}
 \nabla \cdot \mathbf{E} = 0 \\
 \nabla \times \mathbf{B} = \mu_0 \varepsilon_0 \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t}
 \end{array} \tag{1}$$

Esto reduce mucho la complejidad al sacar el tipo de comportamiento de los dos campos. Si desarrollamos estas ecuaciones podemos, llegar a dos ecuaciones diferenciales análogas para definir \mathbf{E} y \mathbf{B} .

$$\begin{array}{l}
 \nabla^2 \mathbf{E} = \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} \\
 \nabla^2 \mathbf{B} = \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \mathbf{B}}{\partial t^2}
 \end{array} \tag{2}$$

Esto nos demuestra que, un campo electromagnético cualquiera, se propaga como una suma de una onda eléctrica y magnética, tienen que cumplir que sean perpendiculares entre si y que también lo sean a la dirección de propagación. Cuando se propague por el vacío, esa velocidad que tiene será la velocidad en el vacío ($c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$).

Óptica geométrica

Creación de imágenes

La óptica geométrica es la rama de la óptica que se encarga de estudiar la luz como si fuera un rayo. Cuando un rayo incide sobre una superficie, su trayectoria se modifica según las leyes de reflexión o refracción. Las lentes están diseñadas para enfocar o dispersar estos rayos de forma controlada, permitiendo la formación de imágenes precisas. En este trabajo, nos enfocamos en las lentes esféricas, donde la ubicación y calidad de la imagen dependen fundamentalmente del punto focal definido por las propiedades geométricas y el material de la lente.

La lente esférica se trata de una lente cuyas superficies son ambas curvas, teniendo así dos puntos focales, uno por cada superficie curvada. Cada superficie tiene su propio radio de curvatura pero nosotros los trataremos como iguales.

La creación de imágenes gracias a esta lente viene dada en la figura (2).

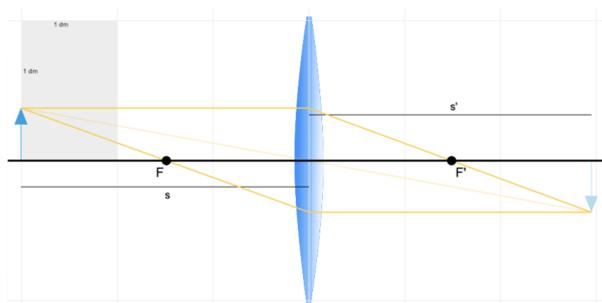


Figura 2: Sistema óptico

Podemos observar los dos focos que coinciden con los radios de curvatura de las dos superficies. Como vemos la flecha al pasar por la lente se genera en la otra parte, eso sí, invirtiendo su altura. Dichos rayos cumplen la ecuación del fabricante de lentes para una lente delgada es.

$$\frac{1}{f} = (n - 1) \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \quad (3)$$

Esto ha sido una breve introducción de cómo funcionan los rayos de luz al interactuar con lentes.

Aproximación paraxial

La aproximación paraxial permite la simplificación del modelo cuando el ángulo de los rayos sobre el eje óptico es muy pequeño. La región paraxial en un sistema óptico es aquella en la que los ángulos de los rayos, tanto de incidencia como de refracción, pueden ser aproximados mediante sus senos y tangentes. Las ecuaciones paraxiales simplifican enormemente los cálculos, facilitando su resolución de manera rápida y eficiente.

Aunque las ecuaciones paraxiales se utilizan habitualmente en los cálculos aproximados en óptica, es importante destacar que son exactas solo dentro de la región paraxial. Por esta razón, se emplean para determinar aberraciones y para comparar las desviaciones de los rayos respecto a su posición ideal.

La aproximación paraxial viene dada por las siguientes expresiones.

$$\left. \begin{aligned} \sin x &\simeq x \\ \cos x &\simeq 1 \\ \tan x &= \frac{\sin x}{\cos x} = x \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

Resolución

La resolución, cuando nos referimos a un sistema óptico, se define como la distancia mínima entre dos objetos para que puedan ser distinguidos como entidades separadas (Valli et al., 2021). La resolución óptica ha estado limitada por el límite de Abbe (ecuación (5)), que establece que la distancia mínima distinguible es proporcional a la longitud de onda de la luz utilizada dividida por el doble del producto del índice de refracción y el ángulo de apertura numérica (NA) (Heintzmann y Ficz, 2006).

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \quad (5)$$

Siendo λ la longitud de onda reflejada por la muestra.

Existen técnicas que permiten una mayor resolución como el microscopio electrónico, sin embargo, no son adecuadas para muestras en vivas, como pudieran ser células, ya que esta técnica

necesita mucho tiempo de fijación (Heintzmann y Ficz, 2006). Por lo tanto para sistemas en movimiento este tipo de técnicas no son muy recomendables.

Límite clásico de la difracción

Partimos de la ley de la difracción:

$$a \cdot \sin \theta = \lambda$$

Despajando el seno del ángulo de difracción.

$$\sin \theta = \frac{\lambda}{a} \quad (6)$$

Siendo a la distancia de la lente y λ la longitud de onda de la onda incidente. La apertura numérica (*Numerical aperture*, NA) de un objetivo de microscopio es la capacidad de la lente para captar luz a una distancia fija de la muestra que queremos observar.

$$NA = n \cdot \sin (\theta_{max}) \quad (7)$$

Siendo n el índice de refracción y θ_{max} el ángulo máximo en el que se pueden captar rayos de luz.

Sabemos que al ángulo máximo tiene que ser igual o mayor al ángulo de la ecuación (6). Por lo que si comparamos las ecuaciones (6) y (7), nos queda una relación.

$$\frac{\lambda}{a} \leq \sin (\theta_{max}) \quad (8)$$

Introducimos la definición de apertura numérica de la ecuación (7) y despejamos la distancia.

$$a \geq \frac{\lambda n}{NA} \quad (9)$$

Como a es la distancia entera de toda la lente y el ángulo está definido sobre la normal del plano. Nos dará, teniendo en cuenta que $d = a/2$.

$$d \geq \frac{\lambda n}{2NA} \quad (10)$$

Como estamos buscando la función donde se maximice la función, nos da el límite clásico de la difracción, también conocido como límite de Abbe.

$$d = \frac{\lambda n}{2NA} \quad (11)$$

Cuando tienes un fotón que interacciona con una red de difracción, dicho haz se refracta en muchas direcciones. Colocando una lente para que recoja esos rayos de luz se puede representar la imagen en otro lugar del espacio. No obstante, si los rayos no cumplen el límite de difracción de Abbe saldrán del radio de captura de dicha lente.

En la figura podemos ver un sistema $4f$, que está compuesto por dos lentes que trasladan la información del haz de luz y la conducen a otra parte del espacio.

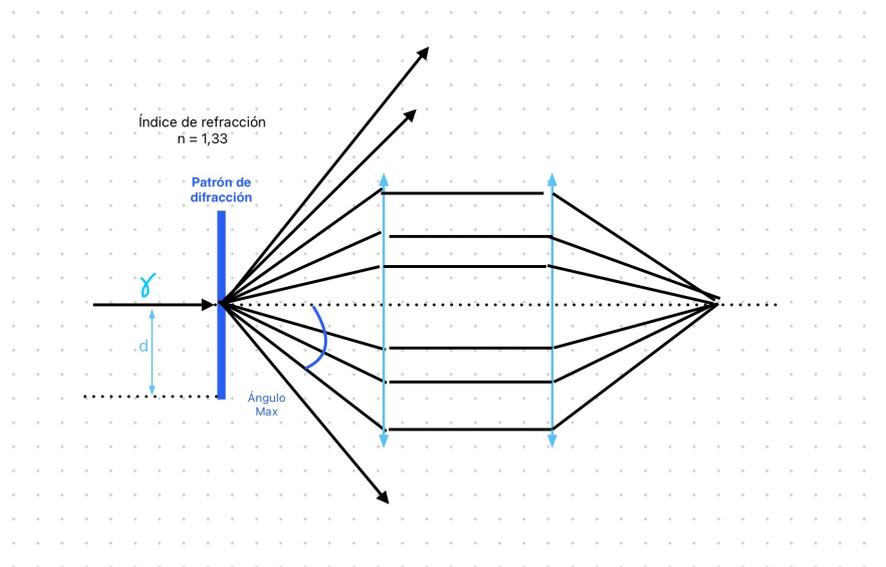


Figura 3: podemos observar un sistema $4f$ que recoge los haces generados al hacer pasar una fuente de luz por un patrón de difracción. Se puede ver que los haces que no pasan por la lente, sino que pasan desapercibidos por fuera de la lente no se capturan.

Cuando estamos hablando de una imagen, los rayos que se escapan son los de mayor frecuencia

por lo que la imagen final aparece con bordes difusos y con menor calidad de la que se esperaba. Esto hace que la imagen no se pueda estudiar con claridad.

Esta pérdida de información es el problema fundamental del límite clásico de la difracción y lo que impide que se estudien correctamente las muestras microscópicas como se debería.

Una manera de mejorar ligeramente este problema es introducir una capa de fluido con un índice de refracción superior. El más común es el aceite ya que tiene un índice de refracción ligeramente superior al del agua, el del agua es $n_{agua} = 1,33$, mientras que el del aceite toma un valor de $n_{aceite} \simeq 1,47$. Este fenómeno se debe a la ley de Snell (12).

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (12)$$

Al aumentar el índice de refracción después del patrón de difracción, para que la ley de Snell mantenga su igualdad, el seno del ángulo θ_2 debe disminuir, por lo que los rayos difractados se “acercan” más al plano perpendicular al patrón de difracción. Esto hace que más rayos incidan a la lente y no se pierda su información. Como vemos en la figura (4)

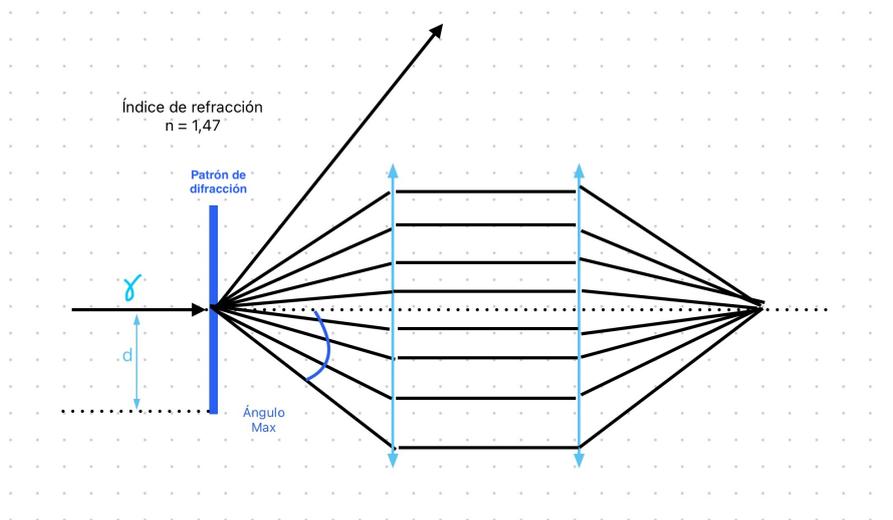


Figura 4: aquí observamos cómo al incrementar el índice de refracción algunos de los rayos que se escapaban y no interactuaban con la lente, sí lo hacen. Esto permitirá una mejor resolución de la muestra ya que hay menos pérdida de información.

Límite de Rayleigh

El límite de Rayleigh es un criterio práctico para la resolución de dos fuentes puntuales, indicando cuánta superposición de sus discos de difracción es viable para que dichas fuentes puedan ser diferenciadas (Leica Microsystems, s.f.-b).

Se basa en su patrón de difracción formado por una apertura circular. Según Rayleigh, dos fuentes puntuales son reconocibles si el máximo de una fuente coincide con el primer mínimo de la segunda.

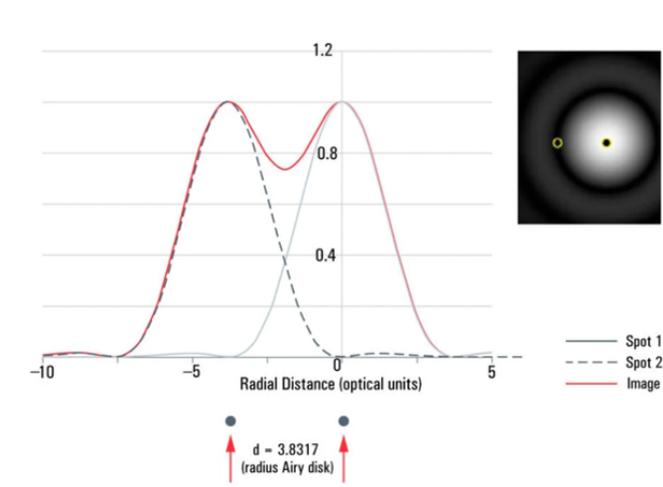


Figura 5

Esta distancia no es la misma que la del límite de Abbe de la ecuación (5), sino que difiere en la constante que acompaña, como se puede ver en la ecuación (13).

$$d = 1,22 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (13)$$

Full Width at Half Maximum

Definimos el ancho completo a la mitad de máximo (Full Width at Half Maximum), como el ancho total de un pico cuando se mide a la mitad de su altura máxima. Este valor es relativamente fácil de medir con un microscopio y se ha convertido en un parámetro generalmente aceptado con fines comparativos (Leica Microsystems, s.f.-b).

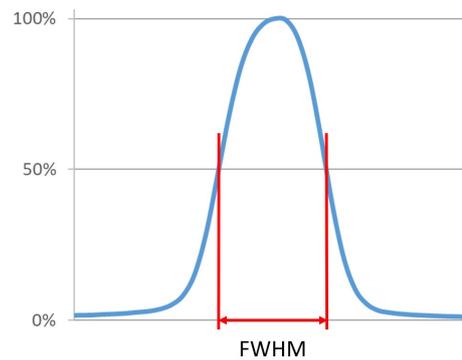


Figura 6: en esta figura vemos qué valores se toman para conseguir el valor de la FWHM

Cuando tu tienes una función $f(x)$, situándose el valor máximo en $f(x_0)$, como se puede observar en la figura (6) . Buscamos dos valores x_1 y x_2 tales que cumpla.

$$f(x_1) = f(x_2) = \frac{1}{2}f(x_0); x_1 < x_0 < x_2 \quad (14)$$

Debido a consideraciones que tendremos más adelante definimos la función como un pico Gaussiano.

$$f(x) = Ae^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (15)$$

Siendo σ la desviación estándar.

Por lo tanto si el máximo da una amplitud A , la mitad de altura, que será donde se encuentren los dos puntos será de $A/2$. Por lo que la función cogiendo x_1 queda.

$$f(x_1) = Ae^{-\frac{(x_1-x_0)^2}{2\sigma^2}} = \frac{A}{2}$$

$$e^{-\frac{(x_1-x_0)^2}{2\sigma^2}} = \frac{1}{2}$$

Si despejamos x_1 nos dará.

$$x_1 = x_0 - \sqrt{2\sigma^2 \ln 2}$$

Y paralelamente.

$$x_2 = x_0 + \sqrt{2\sigma^2 \ln 2}$$

Como definimos FWHM como la distancia $(x_1 - x_2)$, nos queda una relación del tipo.

$$FWHM = 2\sigma\sqrt{2 \ln 2} \quad (16)$$

Si lo queremos trasladar a una Point Spread Function (PSF), deberemos forzarlo a que se parezca al límite de resolución de Abbe, podemos sacar una relación entre el límite de resolución y la desviación estándar.

$$\sigma \simeq 0,26 \frac{\lambda}{NA} \quad (17)$$

Ahora cada vez que definamos el límite de difracción de Abbe nos estaremos refiriendo al valor FWHM.

Aberraciones Geométricas

En óptica geométrica, idealmente los rayos viajan a través del sistema óptico y al salir se focalizan en un mismo punto. Este comportamiento se describe por la homocentricidad, si todos los haces convergen exactamente al mismo lugar, no se presentan aberraciones. En cambio, cuando no existe dicha homocentricidad, los rayos dejan de converger en un punto único y, por tanto, en el plano imagen se obtiene una imagen ligeramente borrosa.

Para entender mejor este hecho, podemos expandir en serie la función $\sin \theta$ (donde θ es el ángulo de salida de un rayo) y no limitarnos únicamente a la aproximación paraxial, sino que si incluimos términos superiores de la expansión de Taylor sobre $\sin \theta$, obtenemos la expresión: (Born y Wolf, 1999)

$$\sin \theta = \theta - \frac{\theta^3}{3!} + \frac{\theta^5}{5!} - \frac{\theta^7}{7!} + \dots \quad (18)$$

Por lo tanto, al tener en cuenta órdenes superiores es cuando aparecen las aberraciones.

Definimos la función de aberración $k(\rho)$ como la medida para definir cuánta aberración hay en un sistema óptico. Es una comparación del recorrido que hace el haz de luz hasta el plano

imagen en un contexto ideal y en el contexto con aberración. Para el caso ideal esta función es cero $k(\rho) = 0$, siendo $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}$, pero en el caso de $k(\rho) \neq 0$ se producirá el desenfoque de la imagen.

Hay distintos tipos de aberraciones según la lente y el ángulo de incidencia sobre la normal de la lente, pero como los sistemas que estamos estudiando producen aberraciones esféricas, en este trabajo únicamente nos centraremos en dichas aberraciones. En la figura (7), se puede observar el sistema óptico y cómo afecta la aberración a la imagen final. Siendo la imagen formada un plano imagen de Gauss, el cual muestra dónde han llegado los rayos (Born y Wolf, 1999).

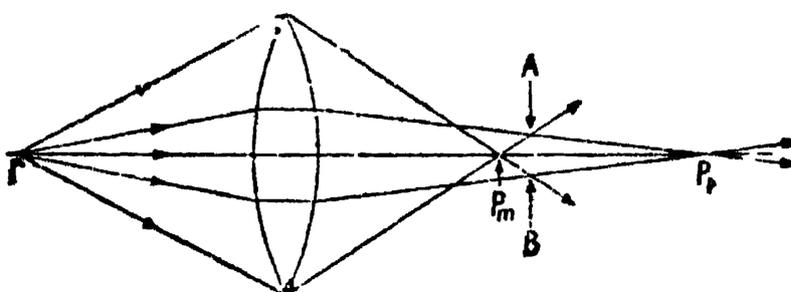


Figura 7: Sistema de una lente la cual presenta en los rayos más alejados del eje óptico una irregularidad en la trayectoria que debería seguir. (Born y Wolf, 1999)

Si nos fijamos bien vemos como los rayos que menos se alejan del centro no se desvían y acaban en el centro de la imagen de Gauss, en cambio los que están más alejados del centro se desvían más provocando que en la imagen de Gauss se pueda observar una imagen con círculos concéntricos figura (8).



Figura 8: Vemos el centro de la imagen donde deberían agruparse todos los rayos, pero aparecen discos a su alrededor

Esta generación de círculos concéntricos que se genera únicamente por aberración son los responsables de que la imagen no salga tan nítida como debería, pudiéndose ver en la figura (8) el patrón que sale.

Para eliminar o intentar minimizar los errores que provocan estas aberraciones se utilizan distintos métodos.

1) Eliminar los rayo que dan problemas

Como ya hemos visto, los rayos que se desvía son aquellos que más se alejan al eje óptico. Al alejarse del eje, la aproximación paraxial es menos eficaz, por lo que al hacer la expansión de Taylor, los haces de los bordes no seguirán la trayectoria que queremos.

La solución es colocar una pupila que corte esos rayos impidiendoles que al salir del sistema óptico lleguen al plano imagen. Con ello se consigue eliminar los discos que se generan alrededor. Esta solución es bastante sencilla y eficaz de realizar en un sistema, pero reduce considerablemente la cantidad de luz, y por tanto información, que llega al plano imagen.

2) Optimizar la aberración

Cuando se nos genera la función aberración, la podemos minimizar derivándola respecto a un término β que llamaremos factor de forma, el cual es un cociente de los dos radios de curvatura de la lente $\beta = R_1/R_2$. Definiendo la función aberración para una onda esférica (Born y Wolf, 1999).

$$k = \frac{h^2}{f'^2} \left[\frac{\beta^2 n^3 + \beta(n + 2n^2 - 2n^3) + n^3 - 2n^2 + 2}{2n(n-1)^2(1-\beta)^2} \right] \quad (19)$$

Siendo los factores h, f' factores que dependen de la lente, y n el índice de refracción del medio. Esta es la ecuación que se tiene que minimizar.

Al utilizar esta técnica se reduce considerablemente la aberración del sistema óptico pero no se elimina del todo, por lo que no sería todo lo eficaz que esperaríamos.

3) Implementación de una lente asférica

Una lente asférica es una lente cuya forma no sigue la curvatura de una esfera perfecta. En lugar de eso, tiene una configuración esferoide. Esta geometría particular mejora el enfoque de

la luz y disminuye las distorsiones que suelen presentarse en las lentes esféricas. En la figura (9) podemos observar cómo es su estructura.

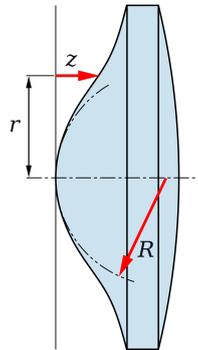


Figura 9: Se puede observar cómo la lente asférica presenta una protuberancia en una cara de la lente

El término z se conoce como altura sagital o conocido como $sag(y)$. Viene dada por la expresión (Optics, 2025).

$$sag(y) = \frac{y^2}{R \left(1 + \sqrt{1 - (1 + k) \cdot \left(\frac{y}{R}\right)^2} \right)} + A_4 y^4 + A_6 y^6 + \dots \quad (20)$$

Siendo k el coeficiente esférico. Podemos observar tres términos con dependencias de y^2 , y^4 y y^6 , respectivamente. El término cuadrático viene dado por la expresión de la onda asférica, en cambio, el término al cuadrado y a la sexta denotan aberraciones. Al introducir estos términos se tiene en cuenta las aberraciones y por lo tanto reducirá ese efecto que no nos interesa

Óptica de difracción

La onda también puede ser tratada, aparte de como una onda. Debido a esto se han de tener en cuenta algunos aspectos y aproximaciones comunes en la óptica difractiva.

Teorema integral Kirchoff

El teorema de Kirchoff estudia el fenómeno de la difracción cuando se encuentra con una barrera con una abertura.

Se basa en la idea de definir el campo a partir del conocimiento de un campo sobre una superficie que encierra dicha región.

Si tenemos una abertura de tamaño arbitrario s , podemos escribir una expresión que explique el comportamiento de una onda incidente.

$$\Psi(r) = \frac{1}{4\pi} \iint_S \left[\Psi(r_s) \frac{\partial}{\partial n_s} G(r, r_s) - G(r, r_s) \frac{\partial \Psi(r_s)}{\partial n_s} \right] dS. \quad (21)$$

Siendo r y r_s el vector de posición del punto de observación y un punto de la superficie s respectivamente. También definimos la ecuación de Green. Supondremos la función como una onda esférica.

$$G(r, r_s) = \frac{e^{ik|r-r_s|}}{4\pi|r-r_s|} \quad (22)$$

La aproximación de Kirchoff establece que en la abertura por donde pasa la onda incidente, la onda es la misma, es decir, se comporta como si no hubiese obstáculo ($\Psi(r_s) \approx \Psi_{incidente}(r)$). Por otro lado, el campo fuera de la abertura se considerará cero ($\Psi(r_s) = 0$), por lo que no habrá aportación de la zona tapada en la propagación de la onda.

Aproximación del campo lejano

Muchas veces, el lugar donde se proyecta la imagen que ha salido de un sistema óptico, se encuentra a una distancia del sistema que suele ser de órdenes superiores a los de la longitud de la onda. Gracias a esto podemos aplicar la aproximación del campo lejano, también conocido como aproximación de Fraunhofer.

Imaginemos que tenemos un campo eléctrico que sigue la definición de onda plana, propagándose a lo largo del eje z . Cuando la hacemos pasar por una abertura, según Kirchoff, se difracta

haciendo así una onda esférica. El campo eléctrico se podrá definir como (Hecht, 2017).

$$\Psi(x_0, y_0, z) \propto \frac{e^{ikz}}{z} \iint_{\text{abertura}} U(x, y) \exp\left[-i \frac{k}{z}(x_0 x + y_0 y)\right] dx dy \quad (23)$$

Si decimos la distancia donde vamos a medir el campo es lo suficiente grande, podemos llegar a la conclusión de que:

$$z \gg k(x^2 + y^2)$$

Si introducimos esto en las exponenciales, nos queda:

$$\exp\{k(x^2 + y^2)/z\} \simeq 1$$

La aproximación de Fraunhofer se utiliza cuando la distancia de observación es significativamente mayor que las dimensiones de la abertura y la longitud de onda. Esto facilita la descripción simplificada de los patrones de difracción. En la práctica, esta aproximación es crucial en campos como la interferometría, el diseño de lentes y la fabricación de dispositivos ópticos, donde el estudio de los patrones de difracción es esencial para el análisis.

Fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión de luz en el que un electrón, al absorber energía de un fotón incidente, se excita desde su estado fundamental a un estado de energía superior. Cuando el electrón regresa a su estado fundamental libera energía en forma de un fotón con una longitud de onda específica. Definimos fluoróforo como cualquier tipo de molécula que puede generar fluorescencia (FluoroFinder, 2018). Como nosotros trabajaremos con muestras de moléculas, nuestras fluoróforos serán las propias moléculas.

La fluorescencia se representa mediante diagramas de Jablonski. Los cuales representan la excitación de los fluoróforos a estados de mayor energía y la desexcitación que produce un fotón. En el estado base, el fluoróforo se encuentra en el estado singlete fundamental S_0 (Leutenegger et al., 2010). Cuando el fluoróforo se excita sube a un nivel de energía superior. En ese nivel

existen varios subniveles vibracionales, el cual se denominará singlete excitado S_1 . El propio fluoróforo se desexcitará hasta el estado excitado de menor energía de S_1 . Todo esto se puede observar en la figura (10).

Dado ese momento se pueden dar dos situaciones, o bien el fluoróforo se relaje espontáneamente hacia el estado base S_0 , emitiendo un fotón o que sea forzado a situarse en un estado excitado S_0^* . Esta última situación se da cuando aplicamos un haz, con intensidad I_s , generando así una emisión estimulada. Si la tasa de emisión estimulada supera la del decaimiento espontáneo, el fluoróforo no emite fluorescencia, incluso cuando está siendo iluminado para su excitación. En otras palabras, el haz STED impide que el fluoróforo permanezca en el estado excitado S_1 , forzándolo constantemente a regresar a su estado fundamental antes de que pueda emitir luz de fluorescencia.

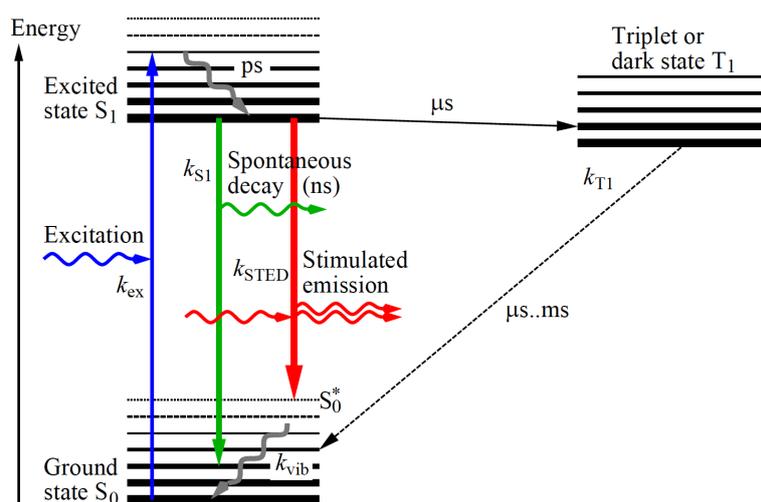


Figura 10: aquí, en este diagrama de Jablonski, podemos observar cómo el fluoróforo se excita hasta el nivel S_1^* , se desexcita hasta el triplete, y al final decae en el estado S_0^* , emitiendo así un fotón (Leutenegger et al., 2010)

Se define el número de fluoróforos excitados como (Rittweger et al., 2009).

$$N = \frac{1}{1 + g \cdot P} \quad (24)$$

Siendo P la potencia del haz STED y g una constante que depende de las características del fluoróforo. Esta constante determina cómo de eficiente es el haz de depleción cuando interactúa con los fluoróforos.

Para un haz continuo con una potencia de unos 9 mW, la fluorescencia se reduce a la mitad (Rittweger et al., 2009). En capítulos posteriores se explicará como se comportan.

Metodologías

Método de superresolución STED

La técnica STED (Simulated Emission Depletion) es una técnica de superresolución cuyo objetivo es mejorar la resolución óptica. La técnica se basa en desactivar selectivamente los fluoróforos que rodean el punto central de excitación.

Los microscopios convencionales (confocales) tienen una limitación, esa limitación es la definida anteriormente con el límite de resolución de Abbe. La limitación física se debe a que las longitudes de onda utilizadas no son lo suficientemente pequeñas como para detectar la muestra. Si tenemos una longitud de onda de 400nm y nuestra muestra es de 500 nm nos será imposible poder detectarla. Esto se conoce como función de dispersión de punto (Point Spread Function, PSF). El límite de resolución es 200 nm, más pequeño que eso no podemos medir físicamente.

La técnica STED consiste en los siguientes pasos; primero se utiliza un haz de excitación que lleva a los fluoróforos a un estado excitado de energía (E_1), desde donde pueden emitir fluorescencia espontánea con una longitud de onda característica (λ_1). Sin embargo, un segundo haz, llamado haz STED, induce emisión estimulada en los fluoróforos periféricos, obligándolos a regresar a su estado fundamental (G) sin emitir fluorescencia detectable. Este haz STED está diseñado en forma de donut, con intensidad máxima en la periferia y cero en el centro, asegurando que solo los fluoróforos exactamente en el centro del punto de excitación emitan fluorescencia. Así, se logra evitar la superposición de emisiones de fluoróforos adyacentes, mejorando la resolución más allá del límite de difracción. Para medir todas las moléculas bastará con desplazar el haz STED colocando en el centro (región con intensidad nula) para así lograr captarlos sin ningún tipo de superposición de ondas de emisión.

Para poder conseguir el haz STED, suponemos una onda monocromática viajando por el espacio situada en un punto P, con unas coordenadas del campo eléctrico del tipo $E=E(x,y,z)$.

Utilizamos la parte real del campo eléctrico, debido a que es el campo que se va a medir.

$$E = \Re\{E(x, y, z) \exp(-i\omega t)\} \quad (25)$$

Creamos el sistema 4f que habíamos comentado anteriormente y le colocamos dos aperturas al inicio y al final de longitud A como se ve en la imagen (11).

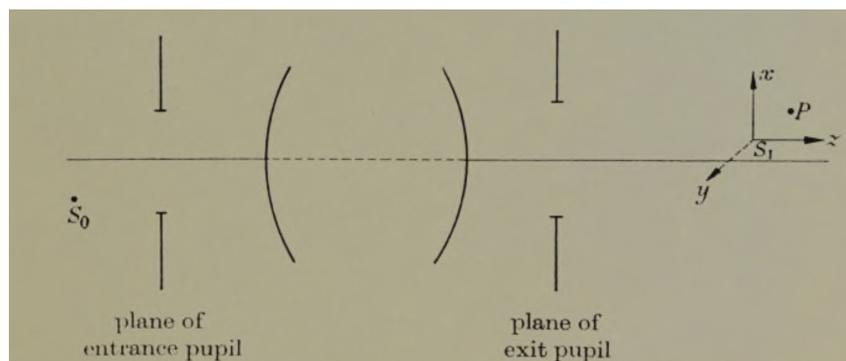


Figura 11

Siendo el eje z la dirección de propagación de la onda. Vemos los dos aperturas que no dejan pasar algunos rayos.

Para cualquier punto que no esté muy cerca de la apertura final, podemos definir una función del vector posición del campo eléctrico, el cual será un espectro angular de ondas planas, lo que quiere decir que será una suma continua, es decir, una integral, de contribuciones de ondas planas distintas (Xie et al., 2013).

$$e(P) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{ik(s_x^2 x + s_y^2 y)} [U(s_x, s_y) e^{iks_z z} + V(s_x, s_y) e^{-iks_z z}] ds_x ds_y \quad (26)$$

Siendo $U(s_x, s_y)$ y $V(s_x, s_y)$ términos de funciones de amplitud. Su vector de dirección vendrá dado por.

$$\vec{S} = (s_x, s_y, s_z) \quad (27)$$

Estas componentes deben cumplir. $s_x^2 + s_y^2 + s_z^2 = 1$ y también la siguiente relación.

$$s_z = \begin{cases} \sqrt{1 - s_x^2 - s_y^2} & \text{si } s_x^2 + s_y^2 \leq 1 \\ i\sqrt{s_x^2 + s_y^2 - 1} & \text{si } s_x^2 + s_y^2 > 1 \end{cases} \quad (28)$$

El primer caso se refiere a cuando tenemos una onda homogénea, y el segundo caso se debe a que tenemos una onda inhomogénea, es decir que decae exponencialmente.

En el caso en el que queramos saber los valores de $U(s_x, s_y)$ y $V(s_x, s_y)$ deberemos quitar de la integración aquellos valores que hacen que s_z haga que la propagación decaiga exponencialmente, como en el caso de una onda inhomogénea, también hay que recalcar que estamos restringidos a valores reales, con más razón deberemos quitar el valor donde s_z es imaginario.

Otra consideración que también hay que tener en cuenta son las aproximaciones de Kirchhoff.

Se asume que el campo en la apertura es igual al que habría si no existiese ningún obstáculo, y se asume que fuera de la apertura el campo es nulo, lo que no hay contribución de campo en la parte bloqueada. Esta aproximación se justifica si las dimensiones lineales de la apertura de salida son grandes en comparación con la longitud de onda, por esta razón, también hay que suponer que el campo se considera lo suficientemente lejos de la apertura.

Habiendo aplicado estas aproximaciones, definimos que para un punto $P'(x, y, z)$ que está en el plano de la apertura de salida nos quedará definido.

$$\int \int_{s_x^2 + s_y^2 \leq 1} e^{ik(s_x x' + s_y y')} [\mathbf{U}(s_x, s_y) e^{iks_z z'} + \mathbf{V}(s_x, s_y) e^{-iks_z z'}] ds_x ds_y = \begin{cases} e^{(i)}(P') & \text{si } P' \in A \\ 0 & \text{si } P' \notin A \end{cases} \quad (29)$$

Por lo que ya tendremos delimitado el campo que fluye a través de la apertura. Para poder calcularlo tenemos que imponer $-ks_z z' \gg 1$. El resultado final nos quedará un vector tipo.

$$e(x, y, z) = -\frac{ik_0}{2\pi} \int \int_{\Omega} \frac{\tilde{\mathbf{a}}(s_x, s_y)}{s_z} e^{ik[\Phi(s_x, s_y) + s_x x + s_y y + s_z z]} ds_x ds_y \quad (30)$$

Siendo Ω el ángulo sólido del campo de la onda que nos interesa y el vector \mathbf{a} el vector de amplitud de cada onda plana. La función de fase $\Phi(s_x, s_y)$, es una medida de la aberración del sistema, también puede determinarse a partir del trazado del rayo.

La aberración en el ángulo sólido, debido a que los frentes de onda en el espacio de la imagen son esféricos, con un centro común en el punto de la imagen de Gauss, nos lleva a poder afirmar.

$$\Phi(s_x, s_y) = 0 \quad (31)$$

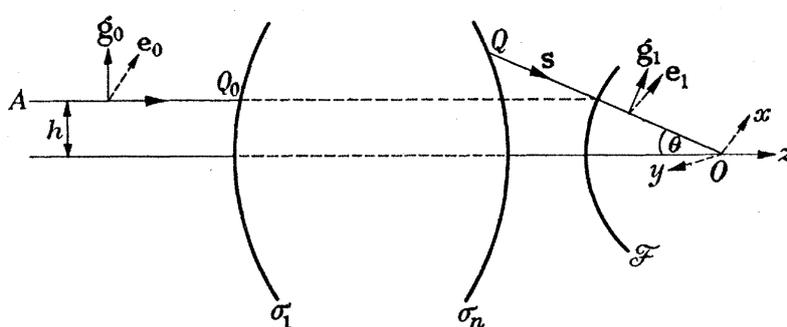


Figura 12

En la región de la pupila de salida se asume que la polarización permanece lineal y que el ángulo entre el vector eléctrico y el plano meridional (el plano que contiene el rayo y el eje del sistema) se mantiene constante. Se introducen dos vectores unitarios, uno en el plano meridional g_0 perpendicular al rayo en el objeto, es decir, antes de interaccionar con el sistema, y otro g_1 perpendicular al rayo de la imagen.

También definimos los vectores a los que describen la amplitud y polarización en el espacio objeto y el espacio imagen respectivamente.

$$\begin{cases} e_0 = l_0 \hat{e}_0 e^{ikY_0} \\ e_1 = l_1 \hat{e}_1 e^{ikY_1} \end{cases} \quad (32)$$

Siendo l_0, l_1 los factores de amplitud de los dos vectores, e_0, e_1 los vectores unitarios y Y_0, Y_1 los factores de la función eikonal. Tanto l_0, l_1 como e_0, e_1 tienen que ser valores reales.

En la imagen (12) podemos observar como la altura se puede definir como.

$$h = f \sin \theta \quad (33)$$

Podemos darnos cuenta de que el vector \mathbf{a} se puede definir con la dirección del vector en el espacio imagen.

$$\tilde{\mathbf{a}} = fl_0 \cos(\theta)^{1/2} \hat{\mathbf{e}}_1 \quad (34)$$

Definimos la potencia que atraviesa en un punto como $l_0^2 \delta S_0$, si nos movemos una distancia muy pequeña para que sea del tipo $l_1^2 \delta S_1$, por conservación de la intensidad de la onda podemos igualarlos.

$$l_0^2 \delta S_0 = l_1^2 \delta S_1 \quad (35)$$

Ahora a partir de la imagen (12) podemos decir que dependen de un cierto ángulo la una de la otra.

$$\delta S_0 = \delta S_1 \cos \theta \quad (36)$$

Viendo la ecuación (36) podemos concluir

$$l_1 = l_0 \cos \theta^{1/2} \quad (37)$$

Introducimos vectores también perpendiculares a la dirección de propagación. Son los vectores \mathbf{g}_0 y \mathbf{g}_1 . Que se relacionan con \mathbf{e}_1 de la manera.

$$\tilde{\mathbf{e}}_1 = (\mathbf{g}_0 \mathbf{i}) \mathbf{g}_1 + \mathbf{g}_0 \mathbf{j} (\mathbf{g}_1 \wedge \mathbf{S}) \quad (38)$$

Por lo tanto la ecuación (34) nos quedará de la manera

$$\tilde{\mathbf{a}} = fl_0 \cos(\theta)^{1/2} [(\mathbf{g}_0 \mathbf{i}) \mathbf{g}_1 + \mathbf{g}_0 \mathbf{j} (\mathbf{g}_1 \wedge \mathbf{S})] \quad (39)$$

Haciendo cambio de coordenadas cartesianas a esféricas, por lo que cambiamos tanto el vector dirección como las coordenadas del vector P.

$$\left. \begin{aligned} s_x &= \sin \theta \cos \phi \\ s_y &= \sin \theta \sin \phi \\ s_z &= \cos \theta \end{aligned} \right\} \quad (40)$$

$$\left. \begin{aligned} x &= r_P \sin \theta_P \cos \phi_P \\ y &= r_P \sin \theta_P \sin \phi_P \\ z &= r_P \cos \theta_P \end{aligned} \right\} \quad (41)$$

Por lo que la suma del vector dirección y la posición de P, dará.

$$s_x x + s_y y + s_z z = r_P [\cos \theta \cos \theta_P + \sin \theta \sin \theta_P \cos (\phi - \phi_P)] = r_P \cos \epsilon \quad (42)$$

Por lo tanto el cambio de los vectores unitarios \mathbf{g}_0 y \mathbf{g}_1 quedarán de la forma.

$$\begin{aligned} \mathbf{g}_0 &= -\cos \phi \mathbf{i} - \sin \phi \mathbf{j} \\ \mathbf{g}_1 &= -\cos \theta \cos \phi \mathbf{i} - \cos \theta \sin \phi \mathbf{j} + \sin \theta \mathbf{k} \end{aligned} \quad (43)$$

Definimos en ángulo sólido como.

$$d\Omega = \frac{ds_x ds_y}{s_z} \quad (44)$$

Como ya estamos trabajando en coordenadas esféricas, podemos reescribirlo como.

$$d\Omega = \sin \theta d\phi d\theta \quad (45)$$

Por lo tanto, sabiendo las contribuciones de los vectores sobre a en los distintos ejes y definiendo en ángulo sólido, podemos reescribir (39) para cada eje como.

$$\left. \begin{aligned} a_x &= fl_0 \cos^{\frac{1}{2}}(\theta) [\cos(\theta) + \sin^2(\phi)(1 - \cos(\theta))] \\ a_y &= fl_0 \cos^{\frac{1}{2}}(\theta) [(\cos(\theta) - 1) \cos(\phi) \sin(\phi)] \\ a_z &= -fl_0 \cos^{\frac{1}{2}}(\theta) \sin(\theta) \cos(\phi) \end{aligned} \right\} \quad (46)$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones (30), (45), (46) y recordando la condición (31), nos queda un campo eléctrico sobre los ejes:

$$\left. \begin{aligned} e_x &= -\frac{iA}{\pi} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} \cos^{\frac{1}{2}} \theta \sin \theta [\cos \theta + (1 - \cos \theta) \sin^2 \phi] e^{ikr_p \cos \epsilon} d\theta d\phi \\ e_y &= \frac{iA}{\pi} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} \cos^{\frac{1}{2}} \theta \sin \theta (1 - \cos \theta) \cos \phi \sin \phi e^{ikr_p \cos \epsilon} d\theta d\phi \\ e_z &= \frac{iA}{\pi} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} \cos^{\frac{1}{2}} \theta \sin^2 \theta \cos \phi e^{ikr_p \cos \epsilon} d\theta d\phi \end{aligned} \right\} \quad (47)$$

Habiendo definido.

$$A = \frac{k_0 f l_0}{2}$$

Definimos función de Bessel como la solución de una ecuación diferencial del tipo.

$$x^2 \frac{d^2 y}{dx^2} + x \frac{dy}{dx} + (x^2 - n^2)y = 0 \quad (48)$$

La solución de esta ecuación se expresa como .

$$y = AJ_n(x) + BY_n(x) \quad (49)$$

Siendo $J_n(x)$ la solución de orden uno y $Y_n(x)$ la solución de orden dos. Cuando nos encontramos en $x = 0$, $J_n(x)$ converge para valores de n que sean enteros no negativos o cero. Por otra parte, cuando x tiende a cero $x \rightarrow 0$, $Y_n(x)$ diverge para valores. Para demostrarlo, vamos a coger tres casos de n para cuando x tiende a cero: un valor no entero y no negativo ($n = 0, 5$), otro valor no entero y negativo ($n = -1, 2$) y otro entero y no negativo ($n = 3$). Introduciendo estos valores en Wolfram Mathematica obtenemos (Ver Cap. (8.3.1)).

$$\begin{aligned} \text{Expansion de BesselJ}[0.5] \text{ cerca de } x=0: & \frac{4.88563 \times 10^{-17}}{\sqrt{x}} + 0.797885 \sqrt{x} - 2.44282 \times 10^{-17} x^{3/2} - 0.132981 x^{5/2} + 2.03568 \times 10^{-18} x^{7/2} + 0.00664904 x^{9/2} + O[x]^{11/2} \\ \text{Expansion de BesselJ}[-1.2] \text{ cerca de } x=0: & \frac{-0.394664 - 0.49333 x^2 + 0.0770828 x^4 + O[x]^6}{x^{1.2}} \\ \text{Expansion de BesselJ}[3] \text{ cerca de } x=0: & \frac{x^3}{48} - \frac{x^5}{768} + O[x]^6 \end{aligned}$$

Como podemos observar, solo en el caso de un valor entero no negativo $n = 3$ el valor converge en lo que parece una expansión geométrica. Por esta razón, solo se estudiará los casos

para valores enteros no negativos, incluyendo el cero, siendo cada uno de los valores será una función entera de ese valor (Figura (13)) (Olver et al., 2010).

Gracias al método de Forbenius, el cual halla una solución de una serie infinita para una ecuación diferencial ordinaria de segundo orden, tal y como expresamos la ecuación diferencial de Bessel (48), podemos expresar la función de Bessel mediante la siguiente ecuación.

$$J_n(x) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k! \Gamma(k+n+1)} \left(\frac{x}{2}\right)^{2k+n} \quad (50)$$

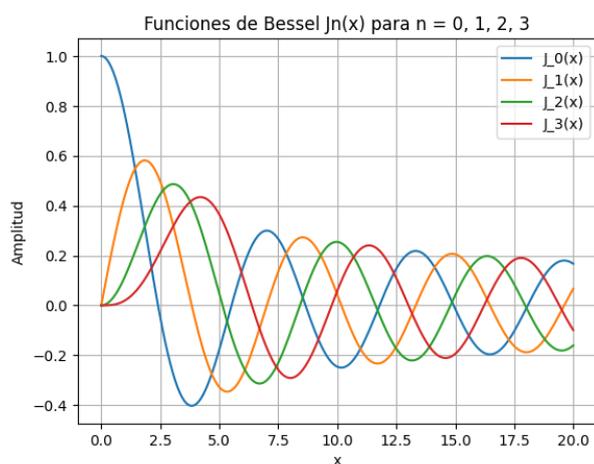


Figura 13: Podemos observar cómo para valores de n más altos (siempre que sean enteros no negativos) la función va decreciendo, pero siempre convergiendo en amplitud cero cuando $x \rightarrow 0$

Por definición, podemos reescribir la integral de ϕ , en función de funciones de Bessel $J_n(x)$, la cual se suele utilizar en coordenadas esféricas.

$$\left. \begin{aligned} \int_0^{2\pi} \cos(n\phi) e^{i\rho \cos(\phi-\alpha)} d\phi &= 2\pi^n J_n(\rho) \cos(n\alpha) \\ \int_0^{2\pi} \sin(n\phi) e^{i\rho \cos(\phi-\alpha)} d\phi &= 2\pi^n J_n(\rho) \sin(n\alpha) \end{aligned} \right\} \quad (51)$$

Sustituyendo en la ecuación (47), nos quedan unas expresiones para el campo eléctrico del tipo.

$$\left. \begin{aligned} e_x &= -iA_{1x}(s_0 + s_2 \cos(2\phi_P)) \\ e_y &= -iA_{1x}s_2 \sin(2\phi_P) \\ e_z &= -2A_{1x}s_1 \cos(\phi_P) \end{aligned} \right\} \quad (52)$$

Siendo s_0, s_1, s_2 las siguientes ecuaciones.

$$\left. \begin{aligned} s_0 &= \int_0^\alpha \cos^{\frac{1}{2}} \theta \sin \theta (1 + \cos \theta) J_0(k_1 \rho_p \sin \theta) \exp(i k_1 z_p \cos \theta) d\theta \\ s_1 &= \int_0^\alpha \cos^{\frac{1}{2}} \theta \sin^2 \theta J_1(k_1 \rho_p \sin(\theta)) \exp(i k_1 z_p \cos(\theta)) d\theta \\ s_2 &= \int_0^\alpha \cos^{\frac{1}{2}} \theta \sin \theta (1 - \cos \theta) J_2(k_1 \rho_p \sin(\theta)) \exp(i k_1 z_p \cos(\theta)) d\theta \end{aligned} \right\} \quad (53)$$

Para los haces tanto de excitación como de agotamiento, la manera de calcular sus intensidades vienen dadas por la relación ($I = |E|^2$). Finalmente podemos definir dos expresiones para casos distintos de intensidad residual. Para un haz pulsado obtendremos (54),

$$I_{res} = I_{ex} \cdot \eta(I_{de}) = I_{ex} \frac{1}{1 + I_{de}/I_s} \quad (54)$$

y la intensidad residual para un haz continuo (CW) (55).

$$I_{res} = I_{ex} \cdot \eta(I_{de}) = I_{ex} \exp(-\ln 2 I_{dep}/I_s) \quad (55)$$

Siendo η la probabilidad de decrecimiento de los fluoróforos. Como se puede observar en ambas ecuaciones, nos damos cuenta hay un término que hace el cociente de la intensidad del rayo de agotamiento y la intensidad de saturación, por lo que cuando las intensidades de los haces son iguales, el cociente es uno y se vuelve a la intensidad que se utilizaría en los microscopios comunes, los cuales no aplican esta técnica.

Por lo tanto mirando la ecuación del límite de resolución podemos añadir un término que tenga en cuenta este coeficiente entre las distintas intensidades de los haces. Por eso mismo reescribimos la ecuación del límite de Abbe (11) como.

$$d = \frac{\lambda_{ex}}{\alpha N A \sqrt{1 + \beta I_{dep}/I_s}} \quad (56)$$

Siendo α y β términos que aparecen de la implementación de este nuevo término (Xie et al., 2013).

Montaje

Para este método se utiliza el concepto de *RESOLFT* (**RE**versible **S**aturable **O**ptical **F**luorescence **T**ransitions). El haz de excitación se introduce en el tren óptico, representado en la imagen con el color verde.

De la misma manera, se añade el haz de agotamiento, representado con el color rojo, pero habiéndole cambiado la polarización con un modulador de fase $0 - 2\pi$. Lo que producirá será el esperado donut de depleción, el cual únicamente actuará en los bordes de la muestra. Ambos haces tienen que estar con un desfase de tiempo muy específico para poder conseguir la imagen mejorada que esperamos.

Estos haces se introducen en el sistema mediante espejos dicróicos, los cuales tienen la propiedad de reflejar la luz selectivamente dependiendo de la longitud de onda que presenten.

El montaje esquemático a seguir será el siguiente.

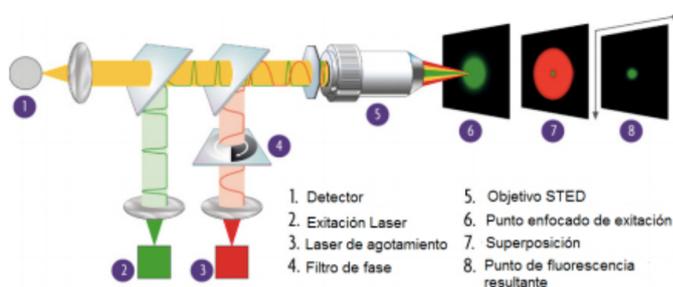


Figura 14: Se puede observar un montaje esquemático para poder aplicar la técnica de superresolución STED [Millán Barrios, 2015]

Gracias a este montaje conseguimos que la PSF que nos genera al final sea más reducida en tamaño debido a que la fluorescencia de los fluoróforos de la periferia se desactivan por el haz. En la figura (15) se observa cómo retorna la función de dispersión a la salida del tren óptico.

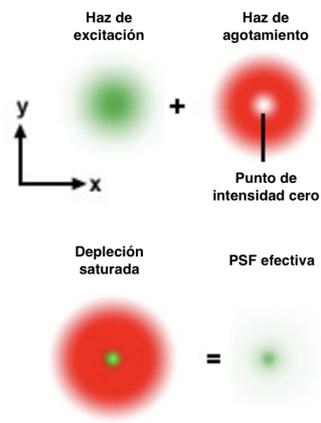


Figura 15: La suma de ambos haces crean la reducción que esperábamos

Dicho haz se irá trasladando para focalizar toda la superficie de la muestra, dando así muchas “fotos” de distintos puntos de la muestra para después juntarlos en post-procesado.

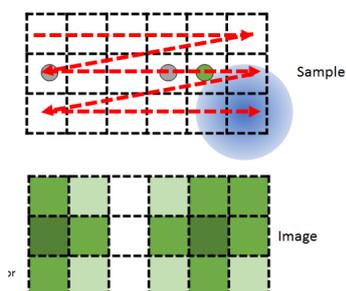


Figura 16: Cada cuadrado corresponde con una foto del trozo superresolucionado (Vanderpoorten, s.f.)

Aquí se puede observar cómo se utiliza. Se va haciendo un barrido y en cada cuadrado se hace una toma con la técnica STED. Cuando ya se ha acabado toda la muestra, se procede a implementarlo todo en una misma imagen.

Realización

Lenguaje de la simulación: Python

Para observar las diferencias de los distintos métodos de resolución y además las implicaciones que dan lugar al crear sistemas ópticos, se hará uso de la herramienta *Python*. Python es un lenguaje de programación con el que se pueden hacer gran variedad de proyectos. Utilizando este lenguaje, y con ayuda de ecuaciones comentadas anteriormente, se estudiarán los sistemas ópticos y sobretodo la comparación tanto del sistema clásico como la técnica de superresolución STED.

Para el correcto seguimiento y entendimiento de las simulaciones que se realizarán en el capítulo siguiente (Cap. 6), hacen falta tener en cuenta unos aspectos adicionales de los previamente explicados. Se utilizarán algunas de las librerías de Python, como por ejemplo *numpy* o *scipy* para introducir símbolos matemáticos, como el número π e introducir términos como la raíz cuadrada. Además para graficar resultados se utilizará la librería *matplotlib*.

Cálculo de la PSF

Una de las definiciones que se utilizará es la PSF, la cual ya se comentó en apartados anteriores pero no se había comentado la ecuación general. Podemos escribir de manera general la PSF de cualquier sistema óptico como:(Hell y Wichmann, 1994)

$$PSF(\lambda) = \frac{2J_1(k \cdot NA \cdot r \sqrt{1 + I/I_s})}{k \cdot NA \cdot r \sqrt{1 + I/I_s}} \quad (57)$$

Siendo J_1 la función de Bessel a primer orden. Cuando el término la intensidad del haz no es muy elevada, el término STED se vuelve uno ($\sqrt{1 + I/I_s} = 1$), por lo que retornamos al sistema clásico. Esta manera de expresar la PSF dará un disco de Airy. Lo que queremos conseguir con esta comparación es ver si la distancia mínima para resolver dos puntos disminuye, para ello tendremos que tener en cuenta tanto el límite de resolución de Abbe como el límite de Rayleigh.

Los parámetros que necesitaremos definir una longitud de onda, la cual será de 400nm, una apertura numérica que se seleccionó teniendo en cuenta que para estos sistemas se utiliza aceite para mejorar la apertura numérica ($NA = 1,4$). Tomamos la saturación del fluoróforo como nuestra unidad básica y la fijamos a uno en unidades arbitrarias. La multiplicamos por valores adimensionales [1,2,5,7,10] que definirán cuántas veces mayor es la intensidad del haz respecto a la saturación.

PSF del límite de Abbe

Se ha detectado que la longitud de onda que se utiliza para la correcta visualización en los microscopios es de 400 nm. Pero, ¿a qué se debe esa longitud de onda en concreto? Este valor de la longitud de onda está hecha a conciencia, por lo que se estudiará a qué se debe y compararemos diferentes longitudes de onda para corroborarlo. Antes tendrán que haberse definido algunos parámetros de la lente por la que va a pasar la luz y ha generar la PSF que estudiaremos, como la distancia focal de la lente ($f = 50$ nm), el radio de la lente ($R = 10$ nm). Para poder observar mejor el cambio de PSFs, se utilizará una apertura numérica distinta, la cual, vendrá dada por la siguiente expresión (Wikipedia contributors, 2025).

$$NA = \frac{R}{\sqrt{R^2 + f^2}} \quad (58)$$

Siendo R el radio de la lente y f la distancia focal de la lente.

Para generar la imagen, primero definiremos el número de haces que queremos utilizar, se han seleccionado 2000 haces para su estudio. Se lanzarán uniformemente los rayos para que cubran la superficie correctamente siguiendo una disposición propia de una PSF circular. Con todo lo comentado anteriormente se puede sacar el límite de Abbe siguiendo la ecuación (11). Los haces se irán registrando siguiendo una geometría gaussiana, lo que nos acabará dando diferentes FWHM y desviaciones estándar para los distintos valores de longitudes de onda que se utilicen.

Se utilizará un cambio de coordenadas polares a cartesianas mediante las expresiones.

$$\left. \begin{aligned} x &= r \cos \theta \\ y &= r \sin \theta \end{aligned} \right\} \quad (59)$$

Siendo θ el ángulo donde se dispondrán los rayos, cada uno tendrá además una r concreta dentro de un radio que nosotros hemos definido R . Por lo que r podrá ir desde 0 hasta R .

Los haces se irán registrando y graficando, y se podrán calcular datos como el FWHM, la desviación de la función y el límite de resolución. Como se ha comentado, podrá variar dependiendo de la longitud de onda que introduzcamos.

Haz STED

En los apartados anteriores hemos comentado cómo debería ser el haz de depleción de la técnica STED para conseguir lo que se está buscando. Como se ha demostrado, el haz tiene que pasar por un polarizador $0 - 2\pi$, lo que hace que se genere el donut. Sabiendo ya la forma que tiene que dar se puede reformular más fácilmente sin tener que introducir todas las fórmulas, ya que Python no es un lenguaje programado específicamente para este tipo de sistemas. Nos fijaremos en cómo varía la intensidad del haz sobre toda la muestra. Para ello introduciremos un parámetro el cual definirá cómo de grande es la región que no es afectada por el haz de depleción (W). Aunque a efectos prácticos este haz no puede ser modificado así como así, para programación es mucho más cómodo realizarlo de esta manera. Definiremos el campo eléctrico como.

$$E = \frac{R}{W} \exp\{-R^2/W^2\} \quad (60)$$

Por lo tanto la intensidad del haz será $I = E^2$. Cabe comentar que se trabajará con coordenadas polares ya que para generar el toroide es bastante más sencillo de trabajar. Para ello se deberá realizar un cambio de coordenadas.

$$\left. \begin{aligned} R &= \sqrt{x^2 + y^2} \\ \theta &= \arctan\{y/x\} \end{aligned} \right\} \quad (61)$$

Cuando se grafique, el resultado de las intensidades se normalizará para que sea más sencillo diferenciar.

Utilización de aberraciones

Estudiadas ya las aberraciones, sus causas y sus posibles formas de reducir su impacto, se implementarán dos de las soluciones que se había comentado (Cap. (4.4)) al código de Python. Las dos que se estudiarán serán tanto la máscara que restringe los haces de luz según su ángulo de incidencia con respecto a la normal, como la implementación de otras lentes como pudiera ser la esférica. .

Para generar la máscara que limitará los haces, se hará uso de la fórmula (18) y también se trabajará con unidades arbitrarias. Se deberá definir tanto el ángulo de apertura ideal como el efectivo. El ideal vendrá definido por la siguiente ecuación.

$$\theta_{ideal} = \arctan\left(-\frac{y_0}{f}\right) \quad (62)$$

Cuando queramos saber el ángulo efectivo, nos lo dará la siguiente ecuación.

$$\theta_{efectiva} = \theta_{ideal} - \frac{\theta_{ideal}^3}{3!} + \frac{\theta_{ideal}^5}{5!} + \frac{\theta_{ideal}^7}{7!} \quad (63)$$

Dependiendo de cuánto sea ese ángulo, pasará la máscara o no. La máscara que se ha utilizado es de 40 unidades. La posición que calcule el programa, hará una discriminación de todos los haces.

Por otra parte, podemos introducir una lente esférica. Para ello necesitaremos la ecuación (20), y hacer uso de la ecuación (62) ya que los haces de luz se comportan de la misma manera. Se utilizarán los valores $A_4 = 10^{-5}$ y $A_6 = 10^{-8}$, ya que como estamos hablando de pequeños cambios, estos valores tendrán que ser pequeños.

Cabe decir que como únicamente nos interesan los rayos que entren en la zona sagital, los demás, aunque aparezcan en la simulación, no se tendrán en cuenta.

Tipos de haces

Se ha demostrado que el haz de agotamiento puede ser de dos tipos: pulsado o continuo (CW). Cada uno de los haces hará que los fluoróforos emitan más o menos luz al desexcitarse. Se estudiará este fenómeno de ambos casos y se comparará para ver cuál será el más efectivo. Para ello se hará uso de la fórmula (24), lo que nos mostrará una gráfica que compare la potencia frente a la fluorescencia de la muestra, que vendrá definido con el número de fluoróforos excitados. Tendremos una proporción (normalizada) de la fluorescencia.

El problema de photobleaching

El photobleaching es el proceso en el que un fluoróforo pierde su capacidad de emitir fluorescencia, al no emitir esa fluorescencia deja de ser funcionalmente válido para el estudio de las muestras ya que no contribuye cuando se requiere que lo haga, podemos decir que se ha “dañado”. Esto ocurre cuando los fluoróforos están expuestos una cantidad muy prolongada de tiempo produciendo fluorescencia estimulada por el haz de depleción. La fórmula que sigue la emisión de fluorescencia en términos de intensidad es.

$$I(t) = I_0 \exp\{-p \cdot t\} \quad (64)$$

Siendo p una constante de photobleaching. Se estudiará el comportamiento de la fluorescencia con una intensidad de haz normalizada. Como la fluorescencia es un fenómeno probabilístico, los fluoróforos no seguirán exactamente la misma trayectoria que la fórmula anteriormente comentada, por lo que se añadirá ruido que se verá representado como una nube de puntos.

Resultados

En este apartado se explicarán las conclusiones a las que se ha llegado haciendo las simulaciones. Dichas simulaciones, como ya se ha comentado, utilizarán los principios físicos tratados en este trabajo.

¿Porqué el límite de Abbe termina en 200 nm?

Se ha comentado que el límite de resolución se obtiene a escalas de 200 nm (Cap. (2)). Para obtener este valor, se tiene que usar una longitud de onda de 400 nm, debido a que la resolución mínima corresponde a medio periodo de la onda empleada ($\lambda/2$).

Se va a proceder a comparar las PSFs de distintos haces con longitudes de onda diferentes.

Compararemos:

- Violeta: $\lambda_{violeta} \sim 400$ nm
- Verde: $\lambda_{verde} \sim 550$ nm
- Rojo profundo: $\lambda_{rojo} \sim 650$ nm

Obviamente no podremos salir del espectro visible (aproximadamente 380 - 780 nm), porque en caso contrario no podríamos observar nada.

Los valores que no variarán serán:

- Distancia focal: 50 mm
- Radio de la Lente: 10 mm
- Apertura numérica: 0,196 (sustituyendo en la ecuación (58))

Colocaremos las PSFs seguidas para que se pueda observar mejor las diferencias.

Como se puede observar claramente, vemos que la función de 400 nm (Figura (17a)) se ve bastante más reducida que las demás. Además si comparamos la imagen (17b) y la (17c), podemos darnos cuenta que la función verde es más pequeña que la roja pese a que no hay

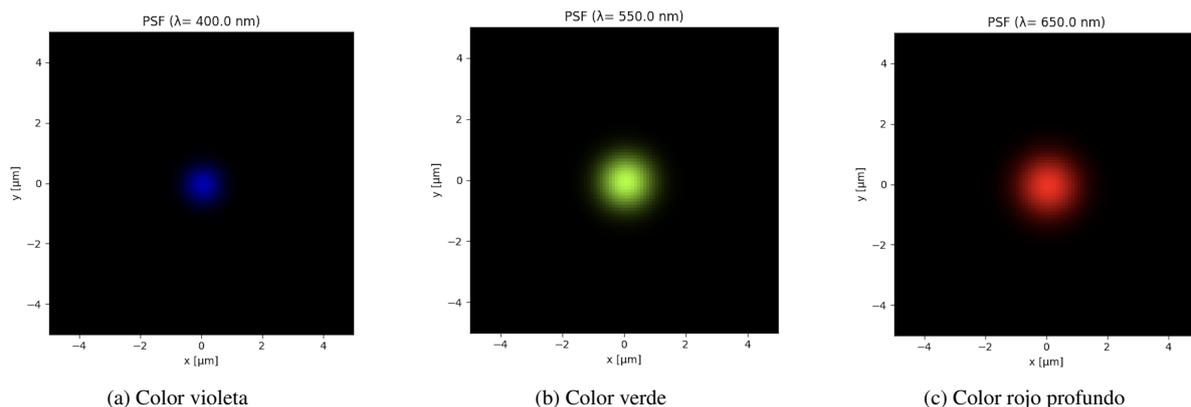


Figura 17: Comparación de las tres PSFs.

tanta diferencia como con la violeta.

Si comparamos numéricamente tanto el límite de resolución como la desviación de cada uno de los casos que se nos presentan, se podrá observar de manera más clara la variación (Figura 1). Como se había comentado en apartados anteriores, el límite de Abbe coincidirá con el FWHM de la función. Se puede ver de manera muy clara que a medida que aumentamos la longitud de

Longitudes de onda (nm)	Límite de Abbe (μm)	σ (μm)
400	1,02	0,43
550	1,4	0,6
650	1,65	0,7

Cuadro 1: Comparativa de la resolución

onda, poco a poco irá haciéndose más grande la PSF, y por tanto, la distancia a la que tienen que estar dos cuerpos para ser resueltos es mayor. Esto implica que al utilizar el microscopio, la imagen que se recibe estará más emborronada.

Corrección de aberraciones

Como bien hemos comentado, las aberraciones pueden ser corregidas para evitar fallos en la formación de imágenes.

Máscara para cortar haces

Esta técnica, como ya se había comentado, discrimina los haces de luz que entran más lejos del eje óptico. Cuando aplicamos a una lente el desarrollo de Taylor de la ecuación paraxial, el resultado es el siguiente.

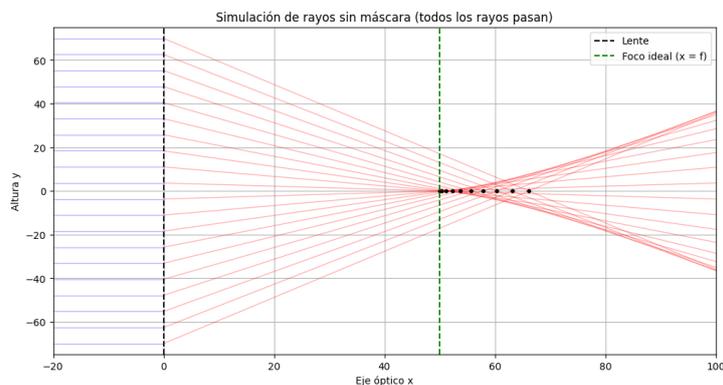


Figura 18: Sistema óptico donde todos los rayos pasan por la lente y llegan a focalizarse. El único inconveniente es que no focalizan en el punto ideal

Los haces no convergen todos en el foco ideal, que sería la distancia focal de la propia lente, sino que convergen detrás de dicho foco. Conforme te alejas del eje óptico, los rayos que salen de la lente se focalizan en puntos más alejados al foco ideal.

Si nos fijamos en la línea del foco, se puede ver como los últimos rayos que cortan dicha línea acaban en -20 y 20 unidades respectivamente. Esto se resume en que hay más desenfoque en la imagen.

Ahora se procederá a colocar la máscara, dejando un hueco en la zona más próxima al eje óptico.

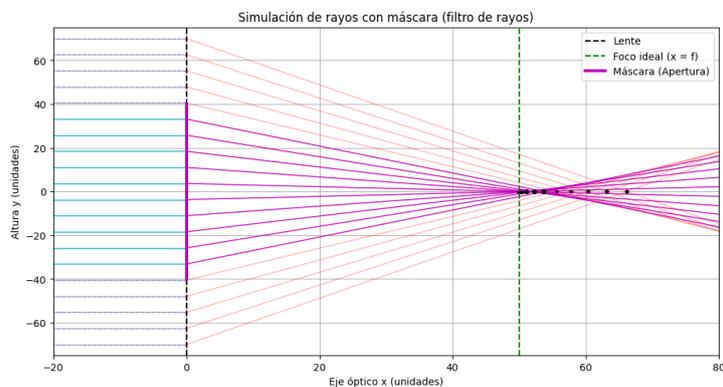


Figura 19: Esta vez, el sistema óptico está limitando los haces que pasan, disminuyendo la distancia entre los haces

La línea de color rosa que se encuentra por encima de la lente representa la apertura. Los haces que pasan por dentro, son los que también están pintados de rosa, son los únicos que conseguirán pasar a través de la lente, haciendo que los demás queden atrapados y no interfieran en la formación de la imagen. En consecuencia, la distancia entre haces en la superficie focal es muchísimo menor, por lo que se traduce en una mejor calidad de la imagen.

Lente esférica

La implementación de una lente esférica puede conseguir una mayor focalización de los haces que atraviesan la superficie de la lente. Con este tipo de lente, solo se focalizarán los rayos que entren dentro de la superficie sagital de la lente, que coincide con el radio ($R = 20$ unidades).

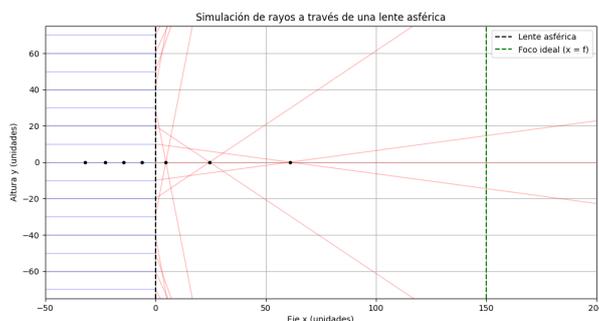


Figura 20: Los rayos que entran en el rango de -20 a 20 unidades, experimentan una focalización hacia el eje óptico

Si comparamos con el sistema óptico con aberraciones (figura 18), puede llegarse a la conclusión de que se focalizan los rayos que están en el rango -20 a 20 unidades. Por otra parte, los demás no se focalizan, por lo que no se tienen en cuenta.

Haz de depleción STED

La mejor manera de generar este haz de depleción es haciendo la polarización circular a izquierdas (Xie et al., 2013), lo que nos dará en ‘donut’ que buscábamos. Por tanto, utilizando el procedimiento que se ha explicado en el capítulo (5.3.4), llegamos a un haz de depleción del siguiente tipo:

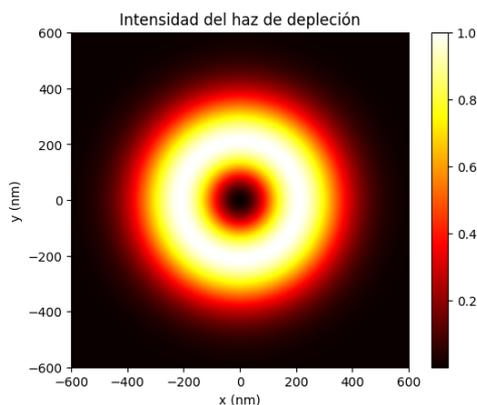


Figura 21: Forma que debe cumplir el haz STED que se encarga de la emisión estimulada

Como bien se lleva diciendo en varios apartados, así es como debe ser el haz, después de pasarlo por un filtro $0 - 2\pi$, polarizado a derechas.

En el caso de que fuera polarizado a izquierdas obtendríamos un resultado que el artículo “*Analytical description of high-aperture STED resolution with $0-2\pi$ vortex phase modulation*” llega a obtener (Figura (22)).

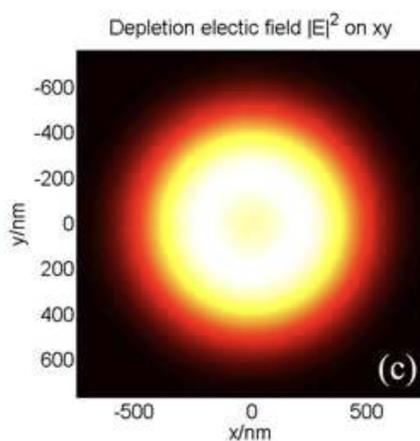


Figura 22: Imagen de haz de depleción con polarizador a izquierdas, sacada de Xie et al., 2013

Como se observa, la figura (21), presenta el centro de intensidad nula, región que es crucial para el funcionamiento de la técnica STED. Por otra parte, la figura (22), no presenta esa región, por lo que polarizar a izquierdas.

En conclusión, el haz tiene que estar polarizado a derechas con el filtro $0 - 2\pi$ para que se pueda observar de manera óptima la superresolución de las muestras.

PSF confocal vs PSF STED

Mediante simulaciones en Python podríamos estudiar el comportamiento de las ondas que generan la imagen superresolucionada.

Comenzaremos mostrando cómo varía la PSF de un sistemas confocal clásico y la PSF que nos sale de utilizar la técnica STED.

Como ya habíamos comentado antes, esta técnica depende de la intensidad de haz, por lo que si variamos ese parámetro la PSF cambiará.

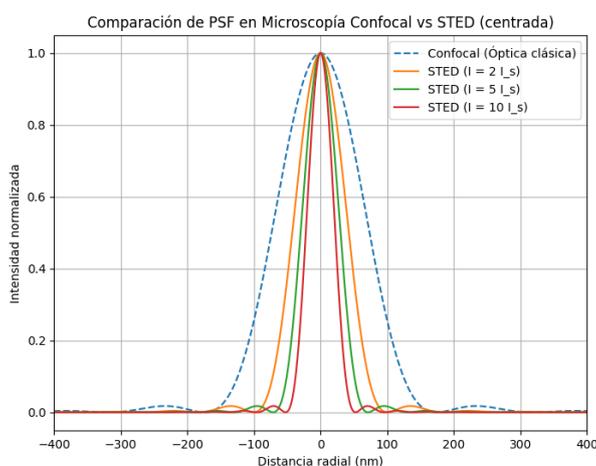


Figura 23: Variación de PSF a $\lambda = 400nm$ [Anexo]

La gráfica (23), podemos observar cómo cambian las anchuras de las PSFs. Cuanto más ancha sea, mayor tendrá que ser la distancia donde se encuentren dos objetos para diferenciarlos, esto ya se había comentado en el apartado del límite de Rayleigh (Cap. 4.3.2).

Véase que hay una mejora bastante notable en las PSFs que se puede observar con más detalle si vemos el FWHM, en la figura (24)

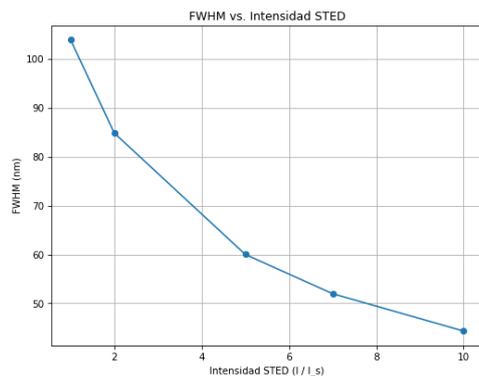


Figura 24: gráfica de los FWHM respecto a la intensidad del haz de depleción

La gráfica decae de manera exponencial, haciendo así que se mejore la resolución. En la siguiente tabla podemos ver los valores exactos para estas intensidades en concreto.

I_{STED}	FWHM (nm)
1 I_s	103,95
2 I_s	84,88
5 I_s	60,02
7 I_s	51,98
10 I_s	44,33

Haz CW vs pulsado

Una vez estudiados los dos tipos de haces que se pueden utilizar en el método de superresolución, se procederá a la comparación en función de cómo afectan a la emisión de los fluoróforos.

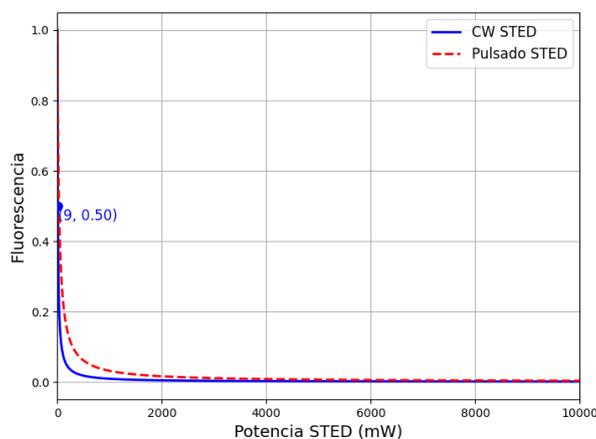


Figura 25: Gráficas que muestran la potencia de los dos tipos de emisión

La emisión de fluorescencia según la potencia disminuye en los dos casos. Como se había

comentado en capítulos anteriores (Cap. 4.6), el punto donde la fluorescencia se reduce la mitad es el (9, 0.5). Este valor solo se había utilizado para un haz continuo, no obstante, como se puede observar el valor parece ser el mismo para un haz pulsado.

Si nos acercamos un poco más a valores bajos de potencia, se podrá distinguir mejor ambos haces.

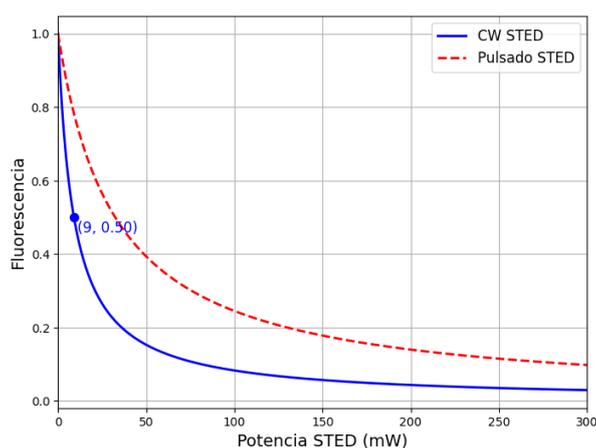


Figura 26: Esta es una visión más cercana a valores bajos de potencia

Aquí ya es más notable la variación entre los dos tipos. Es más notable como el haz pulsado influye menos a la hora de que los fluoróforos emitan fluorescencia. Esto se resume a que con tipo pulsado, la muestra sufre menos “daños” en su forma de emitir luz a partir de fluoróforos, lo que se traduce en un daño menor a la muestra que se está estudiando.

Problema del photobleaching

Al exponer una muestra durante un periodo de tiempo prolongado, esta empieza a tener dificultades a la hora de emitir fluorescencia. Como se puede apreciar en la gráfica (27). Como la emisión de fluorescencia es un fenómeno estadístico, se pondrá ruido para simular lo más posible a la realidad

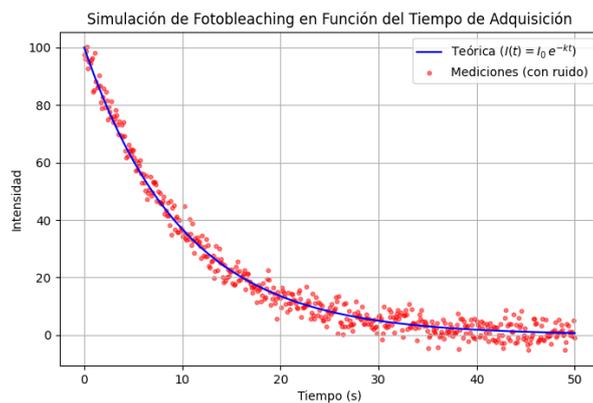


Figura 27: Curva de emisión de fluorescencia conforme pasa el tiempo

Vemos como la fluorescencia va disminuyendo cuanto más está expuesta la muestra al haz. Si se continua muy seguido, se acabará por estropear toda la muestra, impidiendo que pueda emitir más fluorescencia.

Conclusiones

Conclusiones del trabajo

A lo largo de este trabajo se ha podido demostrar cómo la técnica de superresolución STED consigue una mejora frente al límite clásico de la difracción. Además, se ha explicado y corregido fenómenos propios de los sistemas ópticos, crucial para entender cómo se puede llegar a comportar esta técnica cuando se aplica a microscopios.

La mejora del límite de resolución se ha podido notar en cómo ha variado la PSF de la técnica STED frente a la de un microscopio convencional (Figura 23). Esta mejora se fundamenta en la relación,

$$d_{STED} \propto \sqrt{1 + I_{dep}/I} \quad (65)$$

que en regímenes de alta intensidad permite llegar a resoluciones sustancialmente mejores a la del límite clásico.

Gracias a la explicación del problema de las aberraciones, se ha podido reducir su impacto en la creación de imágenes, además de varias maneras. Cada una de las maneras que se utilice, dependerá del tipo de sistema que se esté utilizando y de las limitaciones que se presente debido a la falta de infraestructura. Todas ellas reducen de manera considerable la creación de los rayos que no se rigen por la aproximación paraxial.

La aproximación paraxial no es la única que se ha tenido en cuenta, sino que también se ha trabajado con aproximación del campo lejano. Es cierto que trabaja la óptica de difracción, pero aún así se puede fusionar con la óptica de rayos que se ha estado hablando.

Siguiendo con la difracción, el teorema integral de Kirchoff, resulta muy útil para cualquier sistema que se quiera estudiar.

Estudio previo a la propia técnica STED, es definir tanto qué es el límite de Abbe, como explicar cómo se mide. El FWHM es una herramienta crucial en la rama de la óptica, ya que te permite dar valores exactos a pulsos gaussianos tal y como se ha trabajado en este proyecto.

Aunque la técnica STED pueda ser muy útil en el campo microscópico, puede llegar a tener ciertas desventajas que pueden hacer que no sea tan idílico como parece. El primer inconveniente que sufre es que la muestra debe estar completamente quieta sin ningún tipo de movimiento, lo que hace imposible la observación de muestras vivas con este método. Por lo tanto, este método de superresolución se puede centrar en muestras que no se muevan como pueden ser tejidos de la piel. A su vez, la larga exposición a los rayos por parte de la muestra, pueden ocasionarle daños en su manera de emitir la fluorescencia que hace falta para el estudio con STED. Cuánto tiempo esté expuesto al haz dependerá tanto de qué tipo de muestra es, como a cuanta intensidad se encuentran los haces que componen esta técnica.

Aunque no se deba exceder una suma de tiempo muy elevada, esta técnica requiere de mucho tiempo para ser estudiada. Esto es debido a que el foco debe de moverse por toda la muestra hasta generar la imagen completa de la muestra. Puede tomar tiempo y a su vez requerir más todavía para juntar todas las imágenes generadas en una.

En conjunto, estos avances no solo redefinen el límite óptico, sino que además abren nuevas vías de estudio en biomedicina y nanotecnología.

Implicación con los ODS

Gracias a la superresolución STED se han podido llegar a avances tecnológicos que se creían imposibles. La apertura de puertas hacia esta nueva física se puede proyectar en los objetivos de desarrollo sostenible, los cuales son los objetivos globales diseñados como «un plan para lograr un futuro mejor y más sostenible para todos».

La tecnología STED puede cubrir tanto el tercer objetivo (*Salud y Bienestar*), como el noveno (*industria, innovación e infraestructura*). Puede ser muy importante para el estudio de enfermedades, malformaciones, o incluso para observar cómo se comportan algunos tejidos de células más de cerca. Esto puede llevar a la creación de mejores medicamentos, mejores tratamientos e incluso mejores protocolos de prevención de enfermedades. Cosa que con la tecnología tradicional no se podría avanzar el estudio con tanta rapidez. Debido a eso STED, junto con todas las técnicas de superresolución completan el objetivo de salud y bienestar.

Esta investigación de nuevas maneras de resolución genera un hueco para la investigación en el mundo de la óptica y la microbiología. En consecuencia, se invertirá en innovación y por tanto mejorará la industria. Todo esto favorecerá el desarrollo de la industria.

Referencias

- Born, M., & Wolf, E. (1999). *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light* (3.^a ed.) [Tercera edición]. Cambridge University Press.
- Campus, Z. (2025). STED Concept Tutorial. <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/superresolution/stedconcept/indexflash.html>
- Candes, E., & Fernandez-Granda, C. (2012, noviembre). Towards a Mathematical Theory of Super-Resolution [arXiv:1203.5871 [cs]]. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1203.5871>
- Castro-Longoria, E. (2016). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 9(16), 128. <https://doi.org/10.22201/ceiach.24485691e.2016.16.56907>
- Electromagnetic diffraction in optical systems - I. An integral representation of the image field. (s.f.).
- Electromagnetic diffraction in optical systems, II. Structure of the image field in an aplanatic system. (1959). *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 253(1274), 358-379. <https://doi.org/10.1098/rspa.1959.0200>
- FluoroFinder. (2018, julio). *Newsletter: Tandem Dyes*. <https://fluorofinder.com/newsletter-tandem-dyes>
- Galbraith, C. G., & Galbraith, J. A. (2011). Super-resolution microscopy at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(10), 1607-1611. <https://doi.org/10.1242/jcs.080085>
- Hecht, E. (2017). *Optics* (5 edition. Global edition). Pearson Education, Inc.
- Heintzmann, R., & Ficz, G. (2006). Breaking the resolution limit in light microscopy. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 5(4), 289-301. <https://doi.org/10.1093/bfpg/ell036>
- Hell, S. W., & Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19(11), 780. <https://doi.org/10.1364/OL.19.000780>

- Leica Microsystems. (s.f.-a). *Collecting Light: The Importance of Numerical Aperture in Microscopy*. <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/microscopy-basics/collecting-light-the-importance-of-numerical-aperture-in-microscopy/>
- Leica Microsystems. (s.f.-b). *Microscope Resolution: Concepts, Factors, and Calculation*. <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/microscope-resolution-concepts-factors-and-calculation/>
- Leutenegger, M., Eggeling, C., & Hell, S. W. (2010). Analytical description of STED microscopy performance. *Optics Express*, 18(25), 26417. <https://doi.org/10.1364/OE.18.026417>
- Medina, C., & Velazco, S. (2017). Discusión de la aproximación paraxial y análisis numérico de la aberración de esfericidad. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 40(2). <https://doi.org/10.1590/1806-9126-rbef-2017-0222>
- Millán Barrios, E. J. (2015). La nanoscopía, el reto alcanzado de apreciar las células vivas en su interior. *Avances en Química*, 10. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93341009003>
- Nasse, M. J., & Woehl, J. C. (2010). Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 27(2), 295. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.27.000295>
- Olarte, O. E., Andilla, J., Gualda, E. J., & Loza-Alvarez, P. (2018). Light-sheet microscopy: a tutorial. *Advances in Optics and Photonics*, 10(1), 111. <https://doi.org/10.1364/AOP.10.000111>
- Olver, F. W. J., Lozier, D. W., Boisvert, R. F., & Clark, C. W. (2010). *NIST Handbook of Mathematical Functions*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511807947>
- Optics, E. (2025). All About Aspheric Lenses. <https://www.edmundoptics.com/knowledge-center/application-notes/optics/all-about-aspheric-lenses/>
- Pulstec. (s.f.). *What is Full Width at Half Maximum?* <https://www.pulstec.net/what-is-full-width-at-half-maximum/>
- Rittweger, E., Han, K. Y., Irvine, S. E., Eggeling, C., & Hell, S. W. (2009). STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution. *Nature Photonics*, 3(3), 144-147. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2009.2>

- SVI. (s.f.). *STED Microscopy*. <https://svi.nl/STED-Microscopy>
- Universität Münster – Medizin. (s.f.). *STED Service*. <https://www.medizin.uni-muenster.de/en/impb/service/sted.html>
- Valli, J., Garcia-Burgos, A., Rooney, L. M., Vale De Melo E Oliveira, B., Duncan, R. R., & Rickman, C. (2021). Seeing beyond the limit: A guide to choosing the right super-resolution microscopy technique. *Journal of Biological Chemistry*, 297(1), 100791. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100791>
- Vanderpoorten, O. (s.f.). Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy.
- Wikipedia contributors. (2025). Numerical aperture.
- Willig, K. I., Harke, B., Medda, R., & Hell, S. W. (2007). STED microscopy with continuous wave beams. *Nature Methods*, 4(11), 915-918. <https://doi.org/10.1038/nmeth1108>
- Xie, H., Liu, Y., Jin, D., & Xi, P. (2013). Analytical description of high-aperture STED resolution with 0-2 π vortex phase modulation [arXiv:1302.1646 [physics]]. *Journal of the Optical Society of America A*, 30(8), 1640. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.30.001640>

Anexos

El código se puede encontrar y ejecutar también en el siguiente repositorio de GitHub: <https://github.com/Quiles21/Trabajo-final-de-grado>

`//github.com/Quiles21/Trabajo-final-de-grado`

Librerías básicas necesarias

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.special import j1, jn, yn # jn y yn son las
    funciones Bessel de primer y segundo tipo
from scipy.ndimage import gaussian_filter
```

Comparación PSF (gráfica)

```
# Parámetros originales
wavelength = 400e-9 # Longitud de onda (este valor se variará
    para dar los distintos PSFs)
NA = 1.4
I_s = 1
I_values = [1, 2, 5, 7, 10]

# Definición de PSF clásica
def classica(r, wavelength, NA):
    k = 2 * np.pi / wavelength
    r_norm = k * NA * r
    return (2 * j1(r_norm) / r_norm) ** 2
```

```
# Definición de PSF STED
def sted(r, wavelength, NA, I, I_s):
    factor = np.sqrt(1 + I / I_s)
    k = 2 * np.pi / wavelength
    r_norm = k * NA * r * factor
    return (2 * j1(r_norm) / r_norm) ** 2

def compute_fwhm(r, psf):
    # Considera solo la mitad positiva del eje
    pos_indices = r >= 0
    r_pos = r[pos_indices]
    psf_pos = psf[pos_indices]

    half_max = np.max(psf_pos) / 2.0

    # Buscar el primer índice donde la PSF cae por debajo de
    # half_max
    idx = np.where(psf_pos < half_max)[0]
    if idx.size == 0:
        return None
    i = idx[0]

    # Interpolación lineal entre los puntos para mayor precisión
    if i == 0:
        r_half = r_pos[0]
    else:
        r1, r2 = r_pos[i-1], r_pos[i]
        psf1, psf2 = psf_pos[i-1], psf_pos[i]
```

```
    r_half = r1 + (half_max - psf1) * (r2 - r1) / (psf2 -
        psf1)

    # La FWHM es dos veces r_half por simetría
    return 2 * r_half

# Nuevo rango simétrico
r = np.linspace(-1e-6, 1e-6, 2000)

# Calcular PSF
psf_conf = classica(np.abs(r), wavelength, NA)
psf_sted = [sted(np.abs(r), wavelength, NA, I, I_s) for I in
    I_values]

# Graficar resultados centrados
plt.figure(figsize=(8, 6))
plt.plot(r * 1e9, psf_conf, label="Confocal (Óptica clásica)",
    linestyle="dashed")
for i, I in enumerate(I_values):
    plt.plot(r * 1e9, psf_sted[i], label=f"STED (I = {I} I_s)"
        )

plt.xlabel("Distancia radial (nm)")
plt.ylabel("Intensidad normalizada")
plt.title("Comparación de PSF en Microscopía Confocal vs STED
    (centrada)")
plt.legend()
plt.grid(True)
plt.xlim(-400, 400)
```

```
plt.show()

# Calcular FWHM para cada perfil STED
fwhm_values = []
for I, psf in zip(I_values, psf_sted):
    fwhm = compute_fwhm(r, psf)
    fwhm_values.append(fwhm)
    print(f"I_STED = {I} I_s: FWHM = {fwhm*1e9:.2f} nm")

# Graficar FWHM vs Intensidad STED
plt.figure(figsize=(8, 6))
plt.plot(I_values, np.array(fwhm_values)*1e9, marker='o',
         linestyle='--')
plt.xlabel("Intensidad STED")
plt.ylabel("FWHM (nm)")
plt.grid(True)
plt.show()
```

Funciones de Bessel 1er y 2do tipo

```
# Rango de valores de x
x = np.linspace(0, 20, 200)

# Órdenes de Bessel que queremos evaluar
ordenes = [0, 1, 2, 3]

plt.figure()
for n in ordenes:
```

```
# Funciones de Bessel de primer tipo  $J_n(x)$ 
Jn = jn(n, x)
plt.plot(x, Jn, label=f' $J_{\{n\}}(x)$ ')

plt.title('Funciones de Bessel  $J_n(x)$  para  $n = 0, 1, 2, 3$ ')
plt.xlabel('x')
plt.ylabel('Amplitud')
plt.grid(True)
plt.legend()
plt.show()

plt.figure()
for n in ordenes:
    # Funciones de Bessel de segundo tipo  $Y_n(x)$ 
    Yn = yn(n, x)
    plt.plot(x, Yn, label=f' $Y_{\{n\}}(x)$ ')

plt.xlim([-1, 10])
plt.ylim([-5, 5])

plt.title('Funciones de Bessel  $Y_n(x)$  para órdenes 0, 1, 2 y 3
')
plt.xlabel('x')
plt.ylabel('Amplitud')
plt.grid(True)
plt.legend()
plt.show()
```

Cálculo de los valores de Bessel

Este código es el único procedente de *Mathemática*

```
(*1. Calcular valores de la función de Bessel  $J_n(x)$ *)
BesselJ[0, 5] (*Bessel de orden 0 en  $x=5$ *)
BesselJ[1, 5] (*Bessel de orden 1 en  $x=5$ *)
BesselJ[2, 3.14]

(*2. Definir una función y evaluarla numéricamente*)
f[x_] := BesselJ[2, x]
f[10] (*Evalúa  $J_2(10)$ *)

(*3. Representar varias funciones de Bessel (de primer tipo)
en un \
mismo gráfico*)
Plot[{BesselJ[0, x], BesselJ[1, x], BesselJ[2, x]}, {x, 0,
20},
PlotRange -> All, PlotLegends -> {"J0(x)", "J1(x)", "J2(x)"}]

(*5. Expandir Bessel alrededor de  $x=0$ *)
Series[BesselJ[\[Nu], x], {x, 0, 5}] (*Expansión en serie de
potencia en  $x=0$ *)

(*6. Resolver ecuaciones diferenciales con Bessel*)
DSolve[y''[x] + (1/x) y'[x] + (x^2 - \[Nu]^2) y[x] == 0, y[x],
x]
```

Lambdas

```
# Para ponerles el color según lambda
def wavelength_to_rgb(wavelength_nm, gamma=0.8):

    wavelength = float(wavelength_nm)

    if wavelength < 380.0:
        wavelength = 380.0
    if wavelength > 780.0:
        wavelength = 780.0

    if 380.0 <= wavelength < 440.0:
        t = (wavelength - 380.0) / (440.0 - 380.0)
        R = -(t)
        G = 0.0
        B = 1.0
    elif 440.0 <= wavelength < 490.0:
        R = 0.0
        G = (wavelength - 440.0) / (490.0 - 440.0)
        B = 1.0
    elif 490.0 <= wavelength < 510.0:
        R = 0.0
        G = 1.0
        B = -(wavelength - 510.0) / (510.0 - 490.0)
    elif 510.0 <= wavelength < 580.0:
        R = (wavelength - 510.0) / (580.0 - 510.0)
        G = 1.0
        B = 0.0
```

```
elif 580.0 <= wavelength < 645.0:
    R = 1.0
    G = -(wavelength - 645.0) / (645.0 - 580.0)
    B = 0.0
elif 645.0 <= wavelength <= 780.0:
    R = 1.0
    G = 0.0
    B = 0.0
else:
    # fuera de rango visible
    R = G = B = 0.0

if 380.0 <= wavelength < 420.0:
    alpha = 0.3 + 0.7*(wavelength - 380.0)/(40.0)
elif 700.0 < wavelength <= 780.0:
    alpha = 0.3 + 0.7*(780.0 - wavelength)/(80.0)
else:
    alpha = 1.0

R *= alpha
G *= alpha
B *= alpha

# Corrección gamma (simple):
R = R**gamma
G = G**gamma
B = B**gamma

return (R, G, B)
```



```
NA = R_lente / np.sqrt(R_lente**2 + f**2)
d_abbe = lambda_light / (2.0 * NA) # mm

sigma_mm = d_abbe / 2.355

pixel_size = (xedges[-1] - xedges[0]) / bins
sigma_pix = sigma_mm / pixel_size

H_blurred = gaussian_filter(H_geom, sigma=sigma_pix)

H_max = H_blurred.max()
if H_max > 0:
    H_norm = H_blurred / H_max
else:
    H_norm = H_blurred

Rcol, Gcol, Bcol = wavelength_to_rgb(lambda_nm, gamma=0.8)

PSF_rgb = np.zeros((bins, bins, 3), dtype=float)
PSF_rgb[:, :, 0] = H_norm * Rcol
PSF_rgb[:, :, 1] = H_norm * Gcol
PSF_rgb[:, :, 2] = H_norm * Bcol

Hgeom_norm = H_geom / H_geom.max() if H_geom.max()>0 else
    H_geom
```

```
Geom_rgb = np.zeros((bins, bins, 3), dtype=float)
Geom_rgb[:, :, 0] = Hgeom_norm * Rcol
Geom_rgb[:, :, 1] = Hgeom_norm * Gcol
Geom_rgb[:, :, 2] = Hgeom_norm * Bcol

extent_um = [xedges[0]*1e3, xedges[-1]*1e3, yedges[0]*1e3,
             yedges[-1]*1e3]

fig, ax = plt.subplots(1, 2, figsize=(12, 5))

ax[0].imshow(Geom_rgb[:, :-1, :, :], origin='lower', extent=
             extent_um)
ax[0].set_title("PSF Geométrica (ideal)")
ax[0].set_xlabel("x [ m ]")
ax[0].set_ylabel("y [ m ]")

ax[1].imshow(PSF_rgb[:, :-1, :, :], origin='lower', extent=
             extent_um)
ax[1].set_title("PSF (  $\lambda = 600$  nm)")
ax[1].set_xlabel("x [ m ]")
ax[1].set_ylabel("y [ m ]")

plt.tight_layout()
plt.show()

# Parámetros finales
print("==== Parámetros =====")
print(f"Distancia focal: f = {f} mm")
print(f"Diámetro lente: D = {D} mm")
```

```
print(f"Longitud de onda: {lambda_nm} nm")
print(f"Apertura Numérica (NA) ~ {NA:.3f}")
print(f"Límite de Abbe d ~ {d_abbe*1e3:.3f} m ")
print(f"PSF FWHM = {d_abbe*1e3:.2f} m => sigma ~ {sigma_mm*1
      e3:.2f} m ")
print("=====")
```

STED

```
num_points = 500
x_min, x_max = -600, 600
y_min, y_max = -600, 600
x_vals = np.linspace(x_min, x_max, num_points)
y_vals = np.linspace(y_min, y_max, num_points)
X, Y = np.meshgrid(x_vals, y_vals)

R = np.sqrt(X**2 + Y**2)
Theta = np.arctan2(Y, X)

w = 300.0 # Cambia el radio del anillo

def intensity_donut(R, Theta, w):
    E = (R / w) * np.exp(-R**2 / w**2)
    return E**2
```

```
I_a = intensity_donut(R, Theta, w)
I_a /= I_a.max()
cm = 'hot'

plt.figure()
im = plt.imshow(I_a, extent=[x_min, x_max, y_min, y_max], cmap
                 =cm)
plt.colorbar(im)
plt.xlabel("x (nm)")
plt.ylabel("y (nm)")
plt.title("Intensidad del haz de depleción")
plt.show()
```

Aberraciones con máscara

```
# Parámetros ajustados para que los rayos se crucen antes de
    la distancia focal
f = 50          # Distancia focal
x_lens = 0     # Posición de la lente
x_start = -100 # Inicio del rango en el eje X
x_end = 200    # Fin del rango en el eje X
y_max = 70     # Máxima altura de los rayos
num_rays = 20  # Número de rayos

# Configuración de la figura
plt.figure(figsize=(12, 6))
plt.title("Simulación de rayos sin máscara (todos los rayos
          pasan)")
```

```
# Valores de y0 para los rayos iniciales
y0_values = np.linspace(-y_max, y_max, num_rays)

# Expansión de Taylor para seno (hasta orden 7)
def expansion(theta):
    return theta - (theta**3) / 6 + (theta**5) / 120 - (theta
        **7) / 5040

# Trazado de los rayos
for y0 in y0_values:
    # Pre-lente
    x_pre = np.linspace(x_start, x_lens, 50)
    y_pre = np.full_like(x_pre, y0)
    plt.plot(x_pre, y_pre, 'b', lw=1, alpha=0.3)

    # Cálculo del ángulo tras la lente con corrección de
    # aberración
    theta_ideal = np.arctan(-y0 / f)      # ideal sin
    # aberración
    theta_eff = expansion(theta_ideal)    # corregido (
    # expansión)

    # Post-lente
    x_post = np.linspace(x_lens, x_end, 100)
    y_post = y0 + np.tan(theta_eff) * (x_post - x_lens)
    plt.plot(x_post, y_post, 'r', lw=1, alpha=0.3)

    # Punto de foco de cada rayo
    if np.tan(theta_eff) != 0:
```

```
x_focus = x_lens - y0 / np.tan(theta_eff)
plt.plot(x_focus, 0, 'ko', markersize=3)

# Línea de referencia de la lente y foco ideal
plt.axvline(x=x_lens, color='k', linestyle='--', label='Lente'
)
plt.axvline(x=f, color='g', linestyle='--', label='Foco ideal
(x = f)')

# Etiquetas y leyenda
plt.xlabel("Eje óptico x (unidades)")
plt.ylabel("Altura y (unidades)")
plt.xlim(-20, 100)
plt.ylim(-75, 75)
plt.legend(loc='upper right')
plt.grid(True)

plt.show()

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

# Parámetros ajustados para que los rayos se crucen antes de
la distancia focal
f = 50          # Reducir la distancia focal para que los
rayos se crucen más cerca
x_lens = 0     # Posición de la lente
x_start = -100 # Inicio del rango en el eje X
x_end = 200   # Fin del rango en el eje X
```

```
y_max = 70          # Máxima altura de los rayos
num_rays = 20       # Número de rayos
aperture_stop = 40  # Tamaño de la máscara

# Configuración de la figura
plt.figure(figsize=(12, 6))
plt.title("Simulación de rayos con expansión de la aproximación
          paraxial (Rayos convergiendo antes de la distancia focal)"
          )

# Valores de y0 para los rayos iniciales
y0_values = np.linspace(-y_max, y_max, num_rays)

# Función que usa la expansión de Taylor para el seno
def expansion(theta):
    return theta - (theta**3) / 6 + (theta**5) / 120 - (theta
        **7) / 5040

# Simulación de los rayos con la expansión paraxial
for y0 in y0_values:
    # Generamos los rayos pre-lente (de entrada)
    x_pre = np.linspace(x_start, x_lens, 50)
    y_pre = np.full_like(x_pre, y0)
    plt.plot(x_pre, y_pre, 'b', lw=1, alpha=0.3)

    # Cálculo del ángulo ideal (sin aberración)
    theta_ideal = np.arctan(-y0 / f) # Ángulo ideal (sin
        aberración)
```

```
# Aplicar la expansión de Taylor para la corrección de la
    aberración
theta_eff = expansion(theta_ideal) # Usamos la expansión
    para la corrección

# Generamos los rayos post-lente (después de la lente)
x_post = np.linspace(x_lens, x_end, 100)
y_post = y0 + np.tan(theta_eff) * (x_post - x_lens)
plt.plot(x_post, y_post, 'r', lw=1, alpha=0.3)

# Foco del rayo, con la corrección de la aberración (
    enfoque antes de la distancia focal)
if np.tan(theta_eff) != 0:
    # Ajustamos el punto de enfoque para que sea antes de
        la distancia focal
    x_focus = x_lens - y0 / np.tan(theta_eff)
    plt.plot(x_focus, 0, 'ko', markersize=3)

# Aplicación de la máscara (recorte de los rayos fuera de la
    apertura)
for y0 in y0_values:
    if np.abs(y0) > aperture_stop:
        x_pre = np.linspace(x_start, x_lens, 50)
        y_pre = np.full_like(x_pre, y0)
        plt.plot(x_pre, y_pre, color='gray', lw=1, linestyle='
            --', alpha=0.7)
        continue

# Rayos dentro de la apertura
```

```
x_pre = np.linspace(x_start, x_lens, 50)
y_pre = np.full_like(x_pre, y0)
plt.plot(x_pre, y_pre, 'c', lw=1, alpha=0.9)

# Cálculo de la desviación angular con la expansión de
# Taylor para los rayos dentro de la máscara
theta_ideal = np.arctan(-y0 / f) # Ángulo ideal
theta_eff = expansion(theta_ideal) # Ángulo corregido
# usando la expansión

# Generamos los rayos post-lente dentro de la máscara
x_post = np.linspace(x_lens, x_end, 100)
y_post = y0 + np.tan(theta_eff) * (x_post - x_lens)
plt.plot(x_post, y_post, 'm', lw=1, alpha=0.9)

# Foco corregido con aberración esférica
if np.tan(theta_eff) != 0:
    x_focus = x_lens - y0 / np.tan(theta_eff)
    plt.plot(x_focus, 0, 'ko', markersize=4)

# Línea de referencia de la lente, foco ideal y máscara
plt.axvline(x=x_lens, color='k', linestyle='--', label='Lente'
)
plt.axvline(x=f, color='g', linestyle='--', label='Foco ideal
(x = f)')
plt.plot([x_lens, x_lens], [aperture_stop, -aperture_stop], 'm
-', lw=3, label='Máscara (Apertura)')
```

```
# Etiquetas y leyenda
plt.xlabel("Eje óptico x (unidades)")
plt.ylabel("Altura y (unidades)")
plt.xlim(-20, 80)
plt.ylim(-75, 75)
plt.legend(loc='upper right')
plt.grid(True)

# Mostrar el gráfico
plt.show()
```

Aberración con lente esférica

```
class LenteAsferica:
    def __init__(self, R, k, A4=0, A6=0, f=150, x=0):
        self.R = R
        self.k = k
        self.A4 = A4
        self.A6 = A6
        self.f = f
        self.x = x

    def sag(self, y):
        term = 1 - (1 + self.k) * (y / self.R)**2
        if term < 0:
            term = 0
        sqrt_term = np.sqrt(term)
```

```
        return (y**2) / (self.R * (1 + sqrt_term)) + self.A4 *
                y**4 + self.A6 * y**6

    def sag_derivative(self, y):

        eps = 1e-6
        return (self.sag(y + eps) - self.sag(y - eps)) / (2 *
                eps)

    def refract_angle(self, y0):

        theta_ideal = np.arctan(-y0 / self.f)
        phi = np.arctan(self.sag_derivative(y0))
        theta_effective = theta_ideal - phi
        return theta_effective

# Parámetros
x_start = -100
x_end = 300
num_points_pre = 50
num_points_post = 100
num_rays = 15
y_max = 70

lente = LenteAsferica(R=200, k=-0.5, A4=1e-5, A6=1e-8, f=150,
                    x=0)

plt.figure(figsize=(12, 6))
```

```
plt.title("Simulación de rayos a través de una lente esférica"
)

y0_values = np.linspace(-y_max, y_max, num_rays)

for y0 in y0_values:
    x_pre = np.linspace(x_start, lente.x, num_points_pre)
    y_pre = np.full_like(x_pre, y0)
    plt.plot(x_pre, y_pre, 'b', lw=1, alpha=0.3)

    theta = lente.refract_angle(y0)
    x_post = np.linspace(lente.x, x_end, num_points_post)
    y_post = y0 + np.tan(theta) * (x_post - lente.x)
    plt.plot(x_post, y_post, 'r', lw=1, alpha=0.3)

    if np.tan(theta) != 0:
        x_focus = lente.x - y0 / np.tan(theta)
        plt.plot(x_focus, 0, 'ko', markersize=3)

plt.axvline(x=lente.x, color='k', linestyle='--', label='Lente
    esférica')
plt.axvline(x=lente.f, color='g', linestyle='--', label='Foco
    ideal (x = f)')

plt.xlabel("Eje x (unidades)")
plt.ylabel("Altura y (unidades)")
plt.xlim(-50, 200)
plt.ylim(-75, 75)
plt.legend(loc='upper right')
```

```
plt.grid(True)
plt.show()
```

CW vs pulsed

```
# Parámetros
g = 1/9 # Para que N1(9 mW)      0.5 en modo CW

# mW
P = np.linspace(0, 300, 1000)

# CW
N1_CW = 1 / (1 + g * P)

# Pulsado
N1_pulsed = 1 / (1 + g * (P / 3.6))

plt.figure(figsize=(8, 6))
plt.plot(P, N1_CW, label='CW STED', color='blue', linewidth=2)
plt.plot(P, N1_pulsed, label='Pulsado STED', color='red',
         linestyle='--', linewidth=2)

punto_x = 9
punto_y = 1 / (1 + g * punto_x) # Esto da 0.5
plt.scatter(punto_x, punto_y, color='blue', s=50, zorder=5)
plt.text(punto_x + 2, punto_y - 0.04, f'({punto_x}, {punto_y:.2
f}))', fontsize=12, color='blue')
```

```
plt.xlabel('Potencia STED (mW)', fontsize=14)
plt.ylabel('Fluorescencia', fontsize=14)
plt.legend(fontsize=12)
plt.xlim(0,300)
plt.grid(True)
plt.show()

# Parámetros
g = 1/9 # Para que N1(9 mW) 0.5 en modo CW

# mW
P = np.linspace(0, 10000, 1000)

# CW
N1_CW = 1 / (1 + g * P)

# Pulsado
N1_pulsed = 1 / (1 + g * (P / 3.6))

plt.figure(figsize=(8, 6))
plt.plot(P, N1_CW, label='CW STED', color='blue', linewidth=2)
plt.plot(P, N1_pulsed, label='Pulsado STED', color='red',
         linestyle='--', linewidth=2)

punto_x = 9
punto_y = 1 / (1 + g * punto_x) # Esto da 0.5
plt.scatter(punto_x, punto_y, color='blue', s=50, zorder=5)
```

```
plt.text(punto_x +2, punto_y - 0.04, f'({punto_x}, {punto_y:.2
    f}))', fontsize=12, color='blue')

plt.xlabel('Potencia STED (mW)', fontsize=14)
plt.ylabel('Fluorescencia', fontsize=14)
plt.legend(fontsize=12)
plt.xlim(0,10000)
plt.grid(True)
plt.show()
```

Photobleaching

```
# Parámetros
I0 = 100
k = 0.1          # Constante de fotobleaching [1/s]
t_max = 50      # Tiempo máximo
n_points = 500  # Número de puntos

tiempo = np.linspace(0, t_max, n_points)

# Curva fotobleaching sin ruido (modelo exponencial)
intensidad_teorica = I0 * np.exp(-k * tiempo)

# Añadir ruido pulso gaussiano
ruido = np.random.normal(0, 3, tiempo.shape)
intensidad_medida = intensidad_teorica + ruido

plt.figure(figsize=(8, 5))
```

```
plt.plot(tiempo, intensidad_teorica, 'b-', label='Teórica ( $I(t)=I_0 e^{-kt}$ )')
plt.scatter(tiempo, intensidad_medida, s=10, color='r', alpha=0.5, label='Mediciones (con ruido)')
plt.xlabel('Tiempo (s)')
plt.ylabel('Intensidad')
plt.title('Simulación de Fotobleaching en Función del Tiempo de Adquisición')
plt.legend()
plt.grid(True)
plt.show()
```