

## Cronología del desarrollo del microscopio

- 1590: con posterioridad, algunos autores (Pierre Borel 1620 - 1671 o 1628 - 1689 y Willem Boreel 1591 - 1668) reivindican que en esta fecha los fabricantes holandeses de anteojos, Hans Janssen y su hijo Zacharias Janssen inventaron un microscopio compuesto, pero este hecho no se ha podido verificar.
- 1609: Galileo Galilei desarrolla un *occholino* o microscopio compuesto de una lente convexa y una cóncava.
- 1612: Galileo presenta el *occholino* al rey de Polonia Segismundo III.
- 1619: Cornelius Drebbel (1572 - 1633) presenta en Londres, un microscopio compuesto de dos lentes convexas.
- c.1622: Drebbel presenta su invento en Roma.
- 1624: Galileo presenta su *occholino* al Príncipe Federico Cesi, fundador de la Academia de los Linceos).
- 1625: Giovanni Faber de Bamberg (1574 - 1629), miembro de la Academia de los Linceos, acuña la palabra *microscopio* por analogía con *telescopio*.
- 1665: Robert Hooke publica *Micrographia*, una colección de micrografías biológicas. Acuña la palabra *célula* para las estructuras que descubre en una corteza de corcho.
- 1674: Anton van Leeuwenhoek inventa el microscopio simple.
- 1931: Ernst Ruska y Max Knoll construyen el primer microscopio electrónico.
- 1965: se desarrolla el primer microscopio electrónico de barrido.
- 1981: Gerd Binnig y Heinrich Rohrer desarrollan el microscopio de efecto túnel.
- 1985 Binnig y Rohrer desarrollan el microscopio de fuerza atómica.

## Historia del microscopio

El microscopio fue inventado hacia los años 1610, por Galileo Galilei, según los italianos, o por Zacharias Janssen, en opinión de los holandeses. En 1628 aparece en la obra de William Harvey sobre la circulación sanguínea al observar al microscopio los capilares sanguíneos y Robert Hooke publica su obra *Micrographia*.

En 1665 Hooke observó con un microscopio un delgado corte de corcho y notó que el material era poroso, en su conjunto, formaban cavidades poco profundas a modo de celditas a las que llamó *células*. Se trataba de la primera observación de células muertas. Unos años más tarde, Malpighi, anatomista y biólogo italiano, observó células vivas. Fue el primero en estudiar tejidos vivos al microscopio.

A mediados del siglo XVII un holandés, Anthony van Leeuwenhoek, utilizando microscopios simples de fabricación propia, describió por primera vez protozoos, bacterias, espermatozoides y glóbulos rojos. El microscopista Leeuwenhoek, sin ninguna preparación científica, puede considerarse el fundador de la bacteriología. Tallaba él mismo sus lupas sobre pequeñas esferas de cristal, cuyos diámetros no alcanzaban el milímetro (su campo de visión era muy limitado, de décimas de milímetro). Con estas pequeñas distancias focales alcanzaba los 275 aumentos. Observó los glóbulos de la sangre, las bacterias y los protozoos; examinó por primera vez los glóbulos rojos y descubrió que el semen contiene espermatozoides. Durante su vida no reveló sus métodos secretos y a su muerte, en 1723, 26 de sus aparatos fueron cedidos a la Royal Society de Londres.

Durante el siglo XVIII continuó el progreso y se lograron objetivos acromáticos por asociación de vidrios flint y crown obtenidos en 1740 por H. M. Hall y mejorados por John Dollond. De esta época son los estudios efectuados por Isaac Newton y Leonhard Euler. En el siglo XIX, al descubrirse que la dispersión y la refracción se podían modificar con combinaciones adecuadas de dos o más medios ópticos, se lanzan al mercado objetivos acromáticos excelentes.

Durante el siglo XVIII el microscopio tuvo diversos adelantos mecánicos que aumentaron su estabilidad y su facilidad de uso, aunque no se desarrollaron por el momento mejoras ópticas. Las mejoras más importantes de la óptica surgieron en 1877, cuando Ernst Abbe publicó su teoría del microscopio y, por encargo de Carl Zeiss, mejoró la microscopía de inmersión sustituyendo el agua por aceite de cedro, lo que permite obtener aumentos de 2000. A principios de los años 1930 se había alcanzado el límite teórico para los microscopios ópticos, no consiguiendo éstos aumentos superiores a 500X o 1000X. Sin embargo, existía un deseo científico de observar los detalles de estructuras celulares (núcleo, mitocondria, etc.).

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) fue el primer tipo de microscopio electrónico desarrollado. Utiliza un haz de electrones en lugar de luz para enfocar la muestra consiguiendo aumentos de 100.000X. Fue desarrollada por Max Knoll y Ernst Ruska en Alemania en 1931. Posteriormente, en 1942 se desarrolla el microscopio electrónico de barrido (SEM).

- **Concepto de Microscopio:** es un instrumento que permite observar objetos que son demasiado pequeños para ser vistos a simple vista.
- **Tipos de Microscopio**
  - a. **Simple:** es aquel que solo utiliza un lente de aumento. Es el microscopio más básico. El ejemplo más clásico es la lupa. El microscopio óptico estándar utiliza dos sistemas de lentes alineados.

El objeto por observar se coloca entre el foco y la superficie de la lente, lo que determina la formación de una imagen virtual, derecha y mayor cuanto mayor sea el poder dióptrico del lente y cuanto más alejado esté el punto próximo de la visión nítida del sujeto.

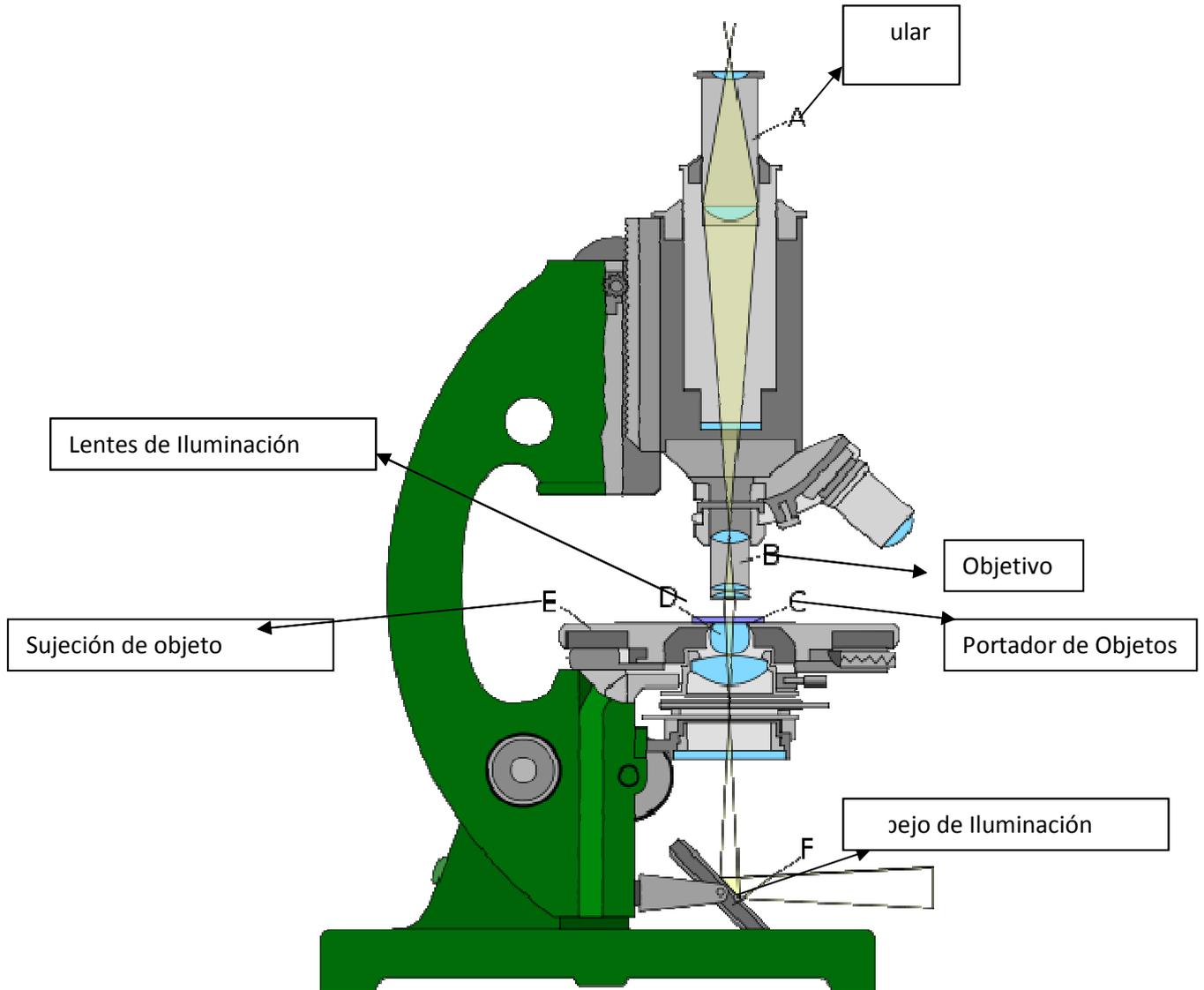
El holandés Antony van Leeuwenhoek construyó microscopios muy eficaces basados en una sola lente. Esos

microscopios no padecían las aberraciones que limitaban tanto la eficacia de los primeros microscopios compuestos, como los empleados por Robert Hooke, y producían una ampliación de hasta 300 veces; gracias a ellos Leeuwenhoek fue capaz incluso de describir por primera vez las bacterias.



**b. Óptico:** es un microscopio basado en lentes ópticos. También se le conoce como microscopio de luz, (que utiliza luz o "fotones") o microscopio de campo claro. El desarrollo de este aparato suele asociarse con los trabajos de Anton van Leeuwenhoek. Los microscopios de Leeuwenhoek constaban de una única lente pequeña y convexa, montada sobre una plancha, con un mecanismo para sujetar el material que se iba a examinar (la muestra o espécimen). Este uso de una única lente convexa se conoce como microscopio simple, en el que se incluye la lupa, entre otros aparatos ópticos.

## i. Partes



- A. **Ocular:** lente situada cerca del ojo del observador. Capta y amplía la imagen formada en los objetivos.
- B. **Objetivo:** lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta, lo que significa que es muy importante este elemento del microscopio, es un elemento vital que permite ver a través de los oculares
- C. **Portador de Objetos:** es donde se colocan las muestras.
- D. **Lentes de iluminación:** es por donde ingresa la luz que permite ver las muestras.

- E. **Sujeción de objetos:** es la que sujeta los objetos donde están las muestras, esto para que estén firmes y no se muevan.
- F. **Espejo de Iluminación:** es aquel que refleja la luz que permite ver la muestra

### **MICROSCOPIO COMPUESTO.**

Es un microscopio óptico que tiene más de una lente de objetivo. Los microscopios compuestos se utilizan especialmente para examinar objetos transparentes, o cortados en láminas tan finas que se transparentan. Se emplea para aumentar o ampliar las imágenes de objetos y organismos no visibles a simple vista. El microscopio óptico común está conformado por tres sistemas:

- **El sistema mecánico** está constituido por una palanca que sirve para sostener, elevar y detener los instrumentos a observar.

La parte mecánica del microscopio comprende el pie, el tubo, el revólver, el asa, la platina, el carro y el tornillo micrométrico. Estos elementos sostienen la parte óptica y de iluminación; además, permiten los desplazamientos necesarios para el enfoque del objeto.

- **El pie y soporte:** Constituye la base sobre la que se apoya el microscopio y tiene por lo general forma de Y o bien es rectangular.
- **La columna o brazo:** llamada también asa, es una pieza en forma de C, unida a la base por su parte inferior mediante una charnela, permitiendo la inclinación del tubo para mejorar la captación de luz cuando se utilizan los espejos. Sostiene el tubo en su porción superior y por el extremo inferior se adapta al pie.

- **El tubo:** tiene forma cilíndrica y está ennegrecido internamente para evitar los reflejos de la luz. En su extremidad superior se colocan los oculares y en el extremo inferior el revólver de objetivos. El tubo se encuentra unido a la parte superior de la columna mediante un sistema de cremalleras, las cuales permiten que el tubo se mueva mediante los tornillos.
- **El tornillo macrométrico:** girando este tornillo, asciende o desciende el tubo del microscopio, deslizándose en sentido vertical gracias a un mecanismo de cremallera. Estos movimientos largos permiten el enfoque rápido de la preparación.
- **El tornillo micrométrico:** mediante el ajuste fino con movimiento casi imperceptible que produce al deslizar el tubo o la platina, se logra el enfoque exacto y nítido de la preparación. Lleva acoplado un tambor graduado en divisiones de 0,001 mm., que se utiliza para precisar sus movimientos y puede medir el espesor de los objetos.
- **La platina:** es una pieza metálica plana en la que se coloca la preparación u objeto que se va a observar. Presenta un orificio, en el eje óptico del tubo, que permite el paso de los rayos luminosos a la preparación. La platina puede ser fija, en cuyo caso permanece inmóvil; en otros casos puede ser giratoria; es decir, mediante tornillos laterales puede centrarse o producir movimientos circulares.

- **Las pinzas:** son dos piezas metálicas que sirven para sujetar la preparación. Se encuentran en la platina.
  
- **Carro móvil:** es un dispositivo que consta de dos tornillos y está colocado sobre la platina, que permite deslizar la preparación con movimiento ortogonal de adelante hacia atrás y de derecha a izquierda.
  
- **El revólver:** es una pieza giratoria provista de orificios en los que se enroscan los objetivos. Al girar el revólver, los objetivos pasan por el eje del tubo y se colocan en posición de trabajo, lo que se nota por el ruido de un piñón que lo fija.
  
- **El sistema de iluminación** comprende un conjunto de instrumentos, dispuestas de tal manera que producen las ranuras de luz. Este sistema tiene como finalidad dirigir la luz natural o artificial de tal manera que ilumine la preparación u objeto que se va a observar en el microscopio de la manera adecuada. Comprende los siguientes elementos:
  - **Fuente de iluminación:** se trata clásicamente de una lámpara incandescente de tungsteno sobrevoltada; en versiones más modernas con leds. Por delante de ella se sitúa un condensador (una lente convergente) e, idealmente, un diafragma de campo, que permite controlar el diámetro de la parte de la preparación que queda iluminada, para evitar que exceda el campo de observación produciendo luces parásitas.

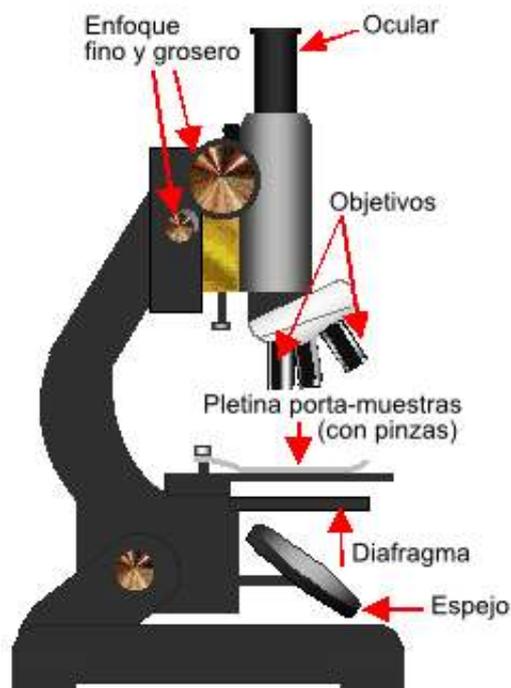
- **El espejo:** necesario si la fuente de iluminación no está construida dentro del microscopio y ya alineada con el sistema óptico, como suele ocurrir en los microscopios modernos. Suele tener dos caras: una cóncava y otra plana. Goza de movimientos en todas las direcciones. La cara cóncava se emplea de preferencia con iluminación artificial, y la plana, para natural (luz solar). Los modelos más modernos no poseen espejos sino una lámpara que cumple la misma función que el espejo.
  
- **Condensador:** está formado por un sistema de lentes, cuya finalidad es concentrar los rayos luminosos sobre el plano de la preparación, formando un cono de luz con el mismo ángulo que el del campo del objetivo. El condensador se sitúa debajo de la platina y su lente superior es generalmente planoconvexa, quedando la cara superior plana en contacto con la preparación cuando se usan objetivos de gran abertura (los de mayor ampliación); existen condensadores de inmersión, que piden que se llene con aceite el espacio entre esa lente superior y la preparación. La abertura numérica máxima del condensador debe ser al menos igual que la del objetivo empleado, o no se logrará aprovechar todo su poder separador. El condensador puede deslizarse verticalmente sobre un sistema de cremallera mediante un tornillo, bajándose para su uso con objetivos de poca potencia
  
- **Diafragma:** el condensador está provisto de un diafragma-iris, que regula su abertura para ajustarla a la del objetivo. Puede emplearse, de manera irregular, para aumentar el contraste, lo que se hace cerrándolo más de lo que conviene si se quiere aprovechar la resolución del sistema óptico

- **El sistema óptico** comprende las partes del microscopio permiten un aumento de los objetos que se pretenden observar mediante filtros llamados "de antigel subsecuente"

El sistema óptico es el encargado de reproducir y aumentar las imágenes mediante el conjunto de lentes que lo componen. Está formado por el ocular y los objetivos. El objetivo proyecta una imagen de la muestra que el ocular luego amplía.

- **El ocular:** se encuentra situado en la parte superior del tubo. Su nombre se debe a la cercanía de la pieza con el ojo del observador. Tiene como función aumentar la imagen formada por el objetivo. Los oculares son intercambiables y sus poderes de aumento van desde 5X hasta 20X. Existen oculares especiales de potencias mayores a 20X y otros que poseen una escala micrométrica; estos últimos tienen la finalidad de medir el tamaño del objeto observado.
- **Los objetivos:** se disponen en una pieza giratoria denominada revólver y producen el aumento de las imágenes de los objetos y organismos, y, por tanto, se hallan cerca de la preparación que se examina. Los objetivos utilizados corrientemente son de dos tipos: objetivos secos y objetivos de inmersión.
  - Los **objetivos secos** se utilizan sin necesidad de colocar sustancia alguna entre ellos y la preparación. En la cara externa llevan una serie de índices que indican el aumento que producen, la abertura numérica y otros datos. Así, por ejemplo, si un objetivo tiene estos datos: plan 40/0,65 y 160/0,17, significa que el objetivo es planacromático, su aumento 40 y su apertura numérica 0,65, calculada para una longitud de tubo de 160 mm. El número de objetivos varía con el tipo de microscopio y el uso a que se destina. Los aumentos de los objetivos secos más frecuentemente utilizados son: 4X, 10X, 20X, 40X y 60X.

- El **objetivo de inmersión** está compuesto por un complicado sistema de lentes. Para observar a través de este objetivo es necesario colocar una gota de aceite de cedro entre el objetivo y la preparación, de manera que la lente frontal entre en contacto con el aceite de cedro. Generalmente, estos objetivos son de 100X y se distingue por uno o dos círculos o anillos de color negro que rodea su extremo inferior



### **Microscopio de luz ultravioleta**

**Microscopio de luz fluorescencia** La lente, que habitualmente es de vidrio es sustituida por lentes de cuarzo y la iluminación se produce por unas lámparas de mercurio. No usa filtros y se observa en placas fotográficas. La variedad de fluorescencia, si usa filtros, y la observación es directa.

**Microscopio de luz ultravioleta** – La imagen en el microscopio de luz ultravioleta depende de la absorción de esa luz por las moléculas de la muestra. La fuente de luz ultravioleta tiene una longitud de onda de 200 nm, por lo tanto puede alcanzar una resolución de 100 nm. La microscopia

ultravioleta no es muy diferente del funcionamiento de un espectrofotómetro pero sus resultados son registrados en fotografías. La muestra no se puede observar directamente a través del ocular porque la luz ultravioleta puede dañar la retina. El método sirve para detectar ácidos nucleicos, proteínas que contienen determinados aminoácidos. Mediante longitudes de ondas específicas para la iluminación se puede obtener mediciones espectrofotométricas para cuantificar el DNA y el RNA de cada célula.

El microscopio de luz ultravioleta utiliza el rango ultravioleta del espectro luminoso en lugar del rango visible, bien para aumentar la resolución con una longitud de onda menor o para mejorar el detalle absorbiendo selectivamente distintas longitudes de onda de la banda ultravioleta. Dado que el vidrio no transmite las longitudes de onda más cortas de la luz ultravioleta, los elementos ópticos de estos microscopios están hechos con cuarzo, fluorita o sistemas de espejos aluminizados. Además, dado que la radiación ultravioleta es invisible, la imagen se muestra con fosforescencia (véase Luminiscencia), en fotografía o con un escáner electrónico. El microscopio de luz ultravioleta se utiliza en la investigación científica.

## **Microscopio de fluorescencia**



El microscopio de fluorescencia Olympus BX61, acoplado con una cámara digital

El **microscopio de fluorescencia** es una variación del microscopio de luz ultravioleta en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada, se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. Se usa para detectar sustancias con autofluorescencia (vitamina A) o sustancias marcadas con fluorocromos

### Microscopio petrográfico



**Microscopio petrográfico antiguo** del Museo Geominero de Madrid.

- **EL MICROSCOPIO PETROGRÁFICO O DE POLARIZACIÓN:** se utiliza para identificar y estimar cuantitativamente los componentes minerales de las rocas ígneas y las rocas metamórficas. Cuenta con un prisma de Nicol u otro tipo de dispositivo para polarizar la luz que pasa a través del espécimen examinado (véase Óptica: Polarización de la luz). Otro prisma Nicol o analizador que determina la polarización de la luz que ha pasado a través del espécimen. El microscopio tiene un soporte giratorio que indica el cambio de polarización acusado por el espécimen.
- **EL MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO:** utiliza un haz enfocado de luz muy intensa en forma de un cono hueco concentrado sobre el espécimen. El objeto iluminado dispersa la luz y se hace así visible contra el fondo oscuro que tiene detrás, como las partículas de polvo

iluminadas por un rayo de sol que se cuela en una habitación cerrada. Por ello las porciones transparentes del espécimen quedan oscuras, mientras que las superficies y partículas se ven brillantes, por la luz que reciben y dispersan en todas las direcciones, incluida la del eje óptico que conecta el espécimen con la pupila del observador. Esta forma de iluminación se utiliza para analizar elementos biológicos transparentes y sin pigmentar, invisibles con iluminación normal, sin fijar la muestra, es decir, sin matarla. También es bastante utilizado en la observación de muestras metalográficas para la observación de detalles en superficies con alta reflectancia.

El objetivo recibe la luz dispersa o refractada por las estructuras del espécimen. Para lograrlo, el microscopio de campo oscuro está equipado con un condensador especial que ilumina la muestra con luz fuerte indirecta. En consecuencia el campo visual se observa detrás de la muestra como un fondo oscuro sobre el cual aparecen pequeñas partículas brillantes de la muestra que reflejan parte de la luz hacia el objetivo.

- **MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES:** permite observar células sin colorear y resulta especialmente útil para células vivas. Este aprovecha las pequeñas diferencias de los índices de refracción en las distintas partes de una célula y en distintas partes de una muestra de tejido. La luz que pasa por regiones de mayor índice de refracción experimenta una deflexión y queda fuera de fase con respecto al haz principal de ondas de luz que pasaron la muestra. Aparea otras longitudes de onda fuera de fase por medio de una serie de anillos ópticos del objetivo y del condensador, anula la amplitud de la porción fuera de fase inicial del haz de luz y produce un contraste útil sobre la imagen. Las partes oscuras de la imagen corresponden a las porciones densas del espécimen; las partes claras de la imagen corresponden a porciones menos densas. Por lo tanto estos microscopios se utilizan

para observar células vivas, tejidos vivos y cortes semifinos no coloreados.

Dos modificaciones del microscopio de fase son el microscopio de interferencia y el microscopio de interferencia diferencial.

Su inventor fue el físico neerlandés Frits Zernike que junto al método de contraste de gases le valió para ganar el Premio Nobel de Física en 1953.

### **Microscopio de luz polarizada**



Microscopio de luz polarizada usado para el estudio de secciones delgadas de roca en petrografía.

**MICROSCOPIOS DE LUZ POLARIZADA:** son microscopios a los que se les han añadido dos polarizadores (uno entre el condensador y la muestra y el otro entre la muestra y el observador). El material que se usa para ello es un cristal de cuarzo y un cristal de Nicol, dejando pasar únicamente la luz que vibra en un único plano (luz polarizada). Esta luz produce en el campo del microscopio claridad u oscuridad, según que los dos nicoles estén paralelos o cruzados.

Algunos compuestos inorgánicos responden al efecto de la luz, éstos tienen un alto grado de orientación molecular (sustancias anisótropas), que hace que la

luz que los atraviesa pueda hacerlo en determinados planos vibratorios atómicos.

El prisma de Nicol permite el paso de luz en un solo plano, así el cuarzo gira la posición de polarización, facilitando la identificación de sustancias que extinguen la luz. Al fenómeno de extinción de luz causado por estos planos atómicos y orientaciones moleculares se llama birrefringencia.

Este tipo de microscopio se usa para poder identificar mejor sustancias cristalinas o fibrosas (como el citoesqueleto), sustancia amiloide, asbesto, colágeno, cristales de uratos, queratina, sílice, y otras de origen exógeno.

El **microscopio confocal** es un microscopio que emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste y/o reconstruir imágenes tridimensionales utilizando un "pinhole" espacial (colimador de orificio delimitante) para eliminar la luz desenfocada o destellos de la lente en especímenes que son más gruesos que el plano focal.<sup>1</sup> Esta técnica ha ido adquiriendo cada vez mayor popularidad entre las comunidades científica e industrial. Se aplica típicamente en las ciencias de la vida y en la inspección de semiconductores

## Microscopio electrónico



**Microscopio electrónico** es aquél que utiliza electrones en lugar de fotones o luz visible para formar imágenes de objetos diminutos. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar una capacidad de aumento muy superior a los microscopios convencionales (hasta 2 aumentos comparados con los de los mejores microscopios ópticos) debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones "visibles".

El primer microscopio electrónico fue diseñado por Ernst Ruska, Max Knoll y Jhener entre 1925 y 1930, quiénes se basaron en los estudios de Louis-Victor de Broglie acerca de las propiedades ondulatorias de los electrones.

Un microscopio electrónico, como el de la imagen, funciona con un haz de electrones generados por un cañón electrónico, acelerados por un alto voltaje y focalizados por medio de lentes magnéticas (todo ello al alto vacío ya que los electrones son absorbidos por el aire). Los electrones atraviesan la muestra (debidamente deshidratada) y la amplificación se produce por un conjunto de lentes magnéticas que forman una imagen sobre una placa fotográfica o sobre una pantalla sensible al impacto de los electrones que transfiere la imagen formada a la pantalla de un ordenador. Los microscopios electrónicos sólo se pueden ver en blanco y negro, puesto que no utilizan la luz, pero se le pueden dar colores en el ordenador. Como se puede apreciar, su funcionamiento es semejante a un monitor monocromático.

### **Limitaciones del microscopio electrónico**

- El limitado diámetro de la apertura no permite que la información detallada alcance la imagen, limitando de este modo la resolución.
- El contraste de amplitud (que radica en la naturaleza corpuscular de los electrones) se debe al contraste de difracción, provocado por la pérdida de electrones del rayo. Es un contraste dominante en especímenes gruesos.
- El contraste de fase (que radica en la naturaleza ondulatoria de los electrones) se debe al contraste de interferencia provocado por los desplazamientos en las fases relativas de las porciones del rayo. Es un contraste dominante en especímenes finos.
- Existen también distintas aberraciones producidas por las lentes: astigmática, esférica y cromática
- El problema de la función de transferencia de contraste (CTF): la CTF describe la respuesta de un sistema óptico a una imagen descompuesta en ondas cuadráticas.

El material biológico presenta dos problemas fundamentales: el entorno de vacío y la transferencia de energía. Para resolverlos, se utilizan distintas técnicas dependiendo del tamaño de la muestra:

- Para muestras grandes como órganos, tejidos o células, se utilizan tres técnicas:

1. La fijación química o la criofijación
2. La inclusión en resinas (criosustitución)
3. La réplica metálica

- Para muestras pequeñas como complejos macromoleculares se utilizan las siguientes técnicas:

1. La **tinción negativa**: los agentes de tinción más usados son el molibdato amónico, el fosfotungstato sódico y sales de uranio como acetato y formiato. Todos ellos presentan las siguientes propiedades: interactúan mínimamente con la muestra y son estables en la interacción con los electrones, son altamente solubles en agua, presentan una alta densidad que favorece el contraste, tienen un punto alto de fusión, tienen un tamaño de grano pequeño.
2. La **réplica metálica**: para construir la réplica metálica se evapora el metal (estaño), que se deposita sobre la muestra a la vez que esta, por el vacío, se disuelve.

- **Tipos de microscopios electrónicos**

- **MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN**

El microscopio electrónico de transmisión emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto cuya imagen se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra. Para utilizar un microscopio electrónico de transmisión debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de

ångstroms. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar la imagen de un objeto hasta un millón de veces.

- **MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO**

En el microscopio electrónico de barrido la muestra es recubierta con una capa de metal delgado, y es barrida con electrones enviados desde un cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectados en una imagen de TV. Su resolución está entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio. Permite obtener imágenes de gran resolución en materiales pétreos, metálicos y orgánicos. La luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie.

### **Aplicaciones en distintas areas**

En el estudio de los circuitos integrados se suele utilizar el microscopio electrónico debido a una curiosa propiedad: Como el campo eléctrico modifica la trayectoria de los electrones, en un circuito integrado en funcionamiento, visto bajo el microscopio electrónico, se puede apreciar el potencial al que está cada elemento del circuito

El microscopio de iones en campo es una variedad de microscopio que puede ser usado para visualizar la ordenación de los átomos que forman la superficie de la punta afilada de una aguja de metal. Fue la primera técnica con la que se consiguió resolver espacialmente átomos individuales. La técnica fue desarrollada por Erwin Müller. En 1951 se publicaron por primera vez imágenes de estructuras atómicas de tungsteno en la revista Zeitschrift für Physik.

En la FIM, se produce una aguja de metal afilada y se coloca en una cámara de ultra alto vacío, que después se llena con un gas

visualizador tal como el helio o el neón. La aguja se enfría hasta alcanzar temperaturas criogénicas (20-100 K). Luego se aplica un voltaje positivo que va de 5.000 a 10.000 voltios sobre la punta. Los átomos de gas absorbidos por la punta se ven ionizados por el fuerte campo eléctrico que existe en las proximidades de ella. La curvatura de la superficie cercana a la punta provoca una magnetización natural; los iones son repelidos bruscamente en dirección perpendicular a la superficie (un efecto de "proyección de punto"). Se coloca un detector de modo que pueda recoger esos iones repelidos; y la imagen formada por todos los iones repelidos puede tener la resolución suficiente como para mostrar átomos individuales en la superficie de la punta.

Al contrario que los microscopios convencionales, donde la resolución espacial se ve limitada por la longitud de onda de las partículas empleadas en la visualización, el microscopio basado en FIM funciona por proyección y alcanza resoluciones atómicas, con una magnificación aproximada de unos pocos millones de aumentos.

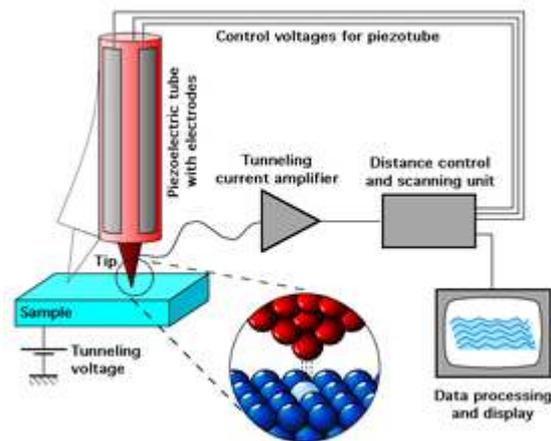
## **MICROSCOPIO DE SONDA DE BARRIDO**

Un **microscopio de sonda de barrido** (también llamado **SPM** por sus siglas en inglés *Scanning Probe Microscopy*) es aquel que tiene el transmisor en la parte exequimal del lente (Objetivo 4x). Este microscopio utiliza una sonda que recorre la superficie del objeto a estudiar.

Su uso en investigaciones científicas es el de regular la imagen mediante un barrido de electrones haciendo que la imagen aumente (10.000.000 nm).

## **MICROSCOPIO DE EFECTO TÚNEL**

El **microscopio de efecto túnel** (*Scanning Tunneling Microscope* STM) o microscopio ciego es un poderoso instrumento que permite visualizar superficies a escala del átomo.



## Su invención

Richard Feynman, premio Nobel de Física en 1965, durante una conferencia celebrada en el Instituto de Tecnología de California (CalTech), en 1959, titulada *"Hay mucho espacio ahí abajo"*, pronosticó que, tarde o temprano, se podrían mover los átomos de manera individual, y construir configuraciones diferentes de las que existen en la naturaleza, y el mundo

En 1981, Heinrich Rohrer y Gerd Binnig, dos científicos del laboratorio IBM de Zúrich, idearon el microscopio de efecto túnel, y abrieron las puertas a este tipo de manipulación. Debido a su invento, en 1986 fueron galardonados con el premio Nobel de Física.

Este sistema basa su funcionamiento en un efecto cuántico, denominado efecto túnel, que se da en distancias menores a la milmillonésima parte de un metro ( $10^{-9}\text{m} = 1 \text{ nm}$ , un nanómetro). El control de este tipo de fenómeno es lo que nos permite hacer topografía de superficies a nivel atómico.

## El efecto túnel

Desde el punto de vista de la mecánica clásica un electrón no puede superar una barrera de potencial superior a su energía.

Sin embargo, según la mecánica cuántica, los electrones no están definidos por una posición precisa, sino por una nube de probabilidad. Esto provoca que en

ciertos sistemas esta nube de probabilidad se extiende hasta el otro lado de una barrera de potencial. Por tanto el electrón puede atravesar la barrera, y contribuir a generar una intensidad eléctrica.

Esta intensidad se denomina intensidad de túnel y es el parámetro de control que nos permite realizar la topografía de superficie.

Este efecto cuántico aparece también en otras ramas de la física. Gamow lo aplicó para dar explicación a la desintegración mediante emisión de partículas alfa en núcleos inestables. En electrónica, hay transistores que basan parte de su funcionamiento en el efecto túnel.

### **Esquema de funcionamiento de un microscopio de efecto túnel**

En una instalación cuyo fin es tomar medidas en escala atómica es necesario que el elemento que se usa como sonda de medida tenga una resolución de esa misma escala. En un microscopio de efecto túnel la sonda es una punta conductora, por ejemplo, de Wolframio. La punta se trata para eliminar los óxidos y para que sea lo más afilada posible. En condiciones ideales hay un solo átomo en el extremo de la sonda.

La instalación consiste en un circuito eléctrico en el que están incluidos la muestra y la punta de medida. Como se ha apuntado anteriormente, el parámetro de medida es la intensidad de corriente túnel. Esta intensidad apenas alcanza los nanoamperios y, además, es muy sensible tanto a la distancia, como a la diferencia de tensión entre la punta y la muestra. Debido a esta sensibilidad todo el sistema debe estar controlado electrónicamente. Así, la toma de medidas y los movimientos de la punta (realizados mediante un dispositivo piezoeléctrico con precisiones que pueden llegar a los 0.05 nm) son controlados por el usuario, a través de las interfaces correspondientes, por ejemplo: mediante un PC de sobremesa.

La punta no toca la muestra, sino que se queda a una distancia equivalente a un par de átomos (del orden de angstroms) de la superficie. El PC registra la trayectoria de la punta y entonces se puede desplegar la información como una imagen en escala de grises a manera de mapa de densidades o mapa

topográfico. A la imagen se le puede agregar color sólo para mejorar el contraste y así observar mejor los cambios detectados.

## **Aplicaciones**

### ***Microscopio con resolución atómica***

En esencia, el proceso consiste en realizar una topografía a intensidad de túnel constante sobre una zona de la superficie de la muestra. El sistema busca los parámetros en los que es capaz de medir una intensidad de túnel prefijada y, a partir de estos, calcula la distancia a la que se encuentra la punta de la superficie. Repitiendo el proceso mientras la punta recorre una determinada área de la superficie problema se obtiene, finalmente, una imagen relacionada con la topografía y la estructura electrónica de dicha área.

### ***Caracterización de dominios magnéticos a nivel atómico***

La topografía de superficies se realiza mediante una punta de wolframio. Si cambiamos esta punta por una compuesta por un material magnético seremos capaces de realizar caracterizaciones de dominios magnéticos a escala atómica. Además, debido a la especial capacidad de algunos microscopios de trabajar a temperaturas muy bajas se pueden realizar caracterizaciones en función de la temperatura. Este tipo de medidas proporcionan información adicional sobre las propiedades magnéticas de los materiales en relación con sus características a escala atómica, en lugar de con sus propiedades macroscópicas.

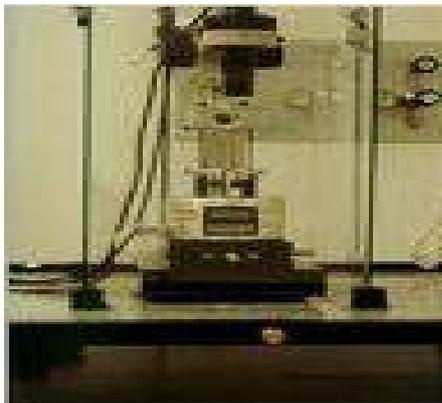
### ***Nanolitografía***

Esta técnica permite manejar átomos sobre superficies como elementos independientes. Las posibilidades de esta tecnología son inmensas dado que prácticamente se pueden crear las estructuras atómicas que se deseen, es decir, la posibilidad de diseñar materiales "a la carta".

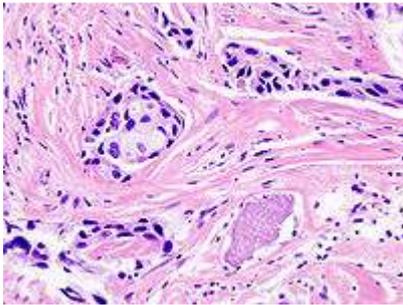
En la imagen se observa un "corral" cuántico creado mediante el desplazamiento de átomos de hierro sobre una superficie de cobalto.

Desde 1989 Donald Eigler y Erhard Schweizer del Centro de investigación Almaden de IBM comenzaron a utilizar el STM para manipular átomos individuales, logrando "escribir" las siglas de la compañía con 35 átomos de xenón sobre una superficie de níquel.

El **Microscopio de fuerza atómica (AFM)**, de sus siglas en inglés *Atomic Force Microscope*) es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los piconewtons. Al rastrear una muestra, es capaz de registrar continuamente su topografía mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica. La sonda va acoplada a un listón o palanca microscópica muy flexible de sólo unos 200  $\mu\text{m}$ . El microscopio de fuerza atómica ha sido esencial en el desarrollo de la nanotecnología, para la caracterización y visualización de muestras a dimensiones nanométricas ( $1 \times 10^{-9} \text{m} = 1 \text{nm}$ ).



## **Microscopio virtual**



Vista microscópica de una muestra histológica humana de mama, teñida con hematoxilina y eosina.

La **microscopía virtual** es un método de revisión y transmisión de imágenes provenientes de un microscopio a través de redes informáticas. Esto permite la visualización independiente de las imágenes por grandes números de personas en distintos lugares. Involucra la unión de tecnologías ópticas microscópicas y digitales.<sup>1</sup>

El estudio a distancia de las imágenes se puede denominar telehistología, telecitología o telepatología dinámica virtual dependiendo del tipo de información biológica. Mediante un microscopio virtual, una persona localizada en cualquier lugar del mundo controlará el área de estudio del preparado microscópico (lámina virtual), y analizará los tejidos o células en el aumento que desee con el simple uso del periféricos como el ratón con unos pocos clics y sin factores horarios intervinientes.

**Autor: Osmel Álvarez**

**Upel Macaro- San Fernando de Apure**