

## **1.- INTRODUCCION**

## **2.- PARTES DEL MICROSCOPIO Y TIPOS**

### **2.1.- PARTES DEL MICROSCOPIO**

### **2.2.- TIPOS DE MICROSCOPIO**

#### **2.2.1.- MICROSCOPIO ÓPTICO O FOTÓNICO**

#### **2.2.2.- MICROSCOPIO ELECTRÓNICO**

- MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (TEM),
- MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM)
- MICROSCOPIO SONDA DE BARRIDO
- MICROSCOPIO DE TÚNEL DE BARRIDO
- MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

## **3.- PROPIEDADES DE LA LUZ**

### **3.1. REFLEXION**

### **3.2.- REFRACCION**

### **3.3.- DIFRACCION**

### **3.4.- POLARIZACION**

### **3.5.- BIRREFRINGENCIA**

## **4.- CONCEPTOS BASICOS DE MICROSCOPIA OPTICA**

### **4.1.- AMPLIACION**

### **4.2. LENTES.**

#### **4.2.1.- TIPOS DE LENTES**

#### **4.2.2.- ABERRACIONES DE LENTES.**

##### **4.2.2.1.- ABERRACIÓN CROMÁTICA**

##### **4.2.2.2.- ABERRACIÓN ESFÉRICA**

##### **4.2.2.3.- COMA**

##### **4.2.2.4.- ASTIGMATISMO**

##### **4.2.2.5.- CURVATURA DE CAMPO**

### **4.3.- OBJETIVOS DEL MICROSCOPIO**

#### **4.3.1.- ABERTURA NUMÉRICA Y RESOLUCIÓN**

#### **4.3.2.- FORMACIÓN DE LA IMAGEN**

#### **4.3.3.- MEDIOS DE LA INMERSIÓN**

### **4.4.- OCULARES (OCULAR)**

## **5.- CONCEPTOS Y FÓRMULAS EN MICROSCOPIA**

### **5.1.- PROFUNDIDAD DE CAMPO Y PROFUNDIDAD DE FOCO**

### **5.2.- INDICE DE REFRACCION**

### **5.3.- RESOLUCION**

### **5.4.- CAMPO VISUAL**

## **1.- INTRODUCCION**

La luz es un fenómeno complejo que clásico se explica con un modelo simple basado en rayos y frentes de onda. La cartilla molecular de la microscopia de las expresiones explora muchos de los aspectos de la luz visible comenzando con una introducción a la radiación electromagnética y la continuación a través a la visión humana y a la opinión del color. . Un grupo de los científicos, que suscribieron a la teoría de la onda, centró sus discusiones en los descubrimientos del remiendo Christiaan Huygens.

El campo de oposición citó experimentos del prisma de sir Isaac Newton's como prueba que la luz viajó como ducha de partículas, cada procedimiento en una línea recta hasta que fue refractada, absorbida, reflejada, difractada o disturbada de una cierta otra manera. Cerca de 200 años más tarde, los mecánicos del cuántum nacieron de la investigación de Einstein, Planck, de Broglie, Neils Bohr, Erwin Schrödinger, y otros que procuraron explicar cómo la radiación electromagnética puede exhibir lo que ahora se ha llamado dualidad , o ambos partícula como y comportamiento ondulado. La luz se comporta ocasionalmente como partícula, y en otras veces como onda. Este, o dóblese, papel complementario del comportamiento de la luz se puede emplear para describir todas las características sabidas que se han observado experimental, extendiéndose de la refracción, de la reflexión, de interferencia, y de la difracción, a los resultados con la luz polarizada y el efecto fotoeléctrico.

Los microscopios son instrumentos diseñados para producir imágenes visuales o fotográficas magnificadas de objetos pequeños. El microscopio debe lograr tres tareas: produzca una imagen magnificada del espécimen, separe los detalles en la imagen, y haga los detalles visibles al ojo o a la cámara fotográfica humano. Este grupo de instrumentos incluye no solamente diseños de la múltiple-lente con objetivos y condensadores, pero también los solos dispositivos muy simples de la lente que son a menudo hand-held, por ejemplo una lupa.

## **2.- PARTES DEL MICROSCOPIO Y TIPOS**

El ojo humano sólo tiene un poder de resolución de aproximadamente 1/10 milímetros, o 100 micrómetros. El poder de resolución es una medida de la capacidad para distinguir un objeto de otro; es la distancia mínima que debe haber entre dos objetos para que sean percibidos como objetos separados. Esta limitación del ser humano ha llevado a los científicos a desarrollar uno de los inventos más importantes de la historia : el microscopio.

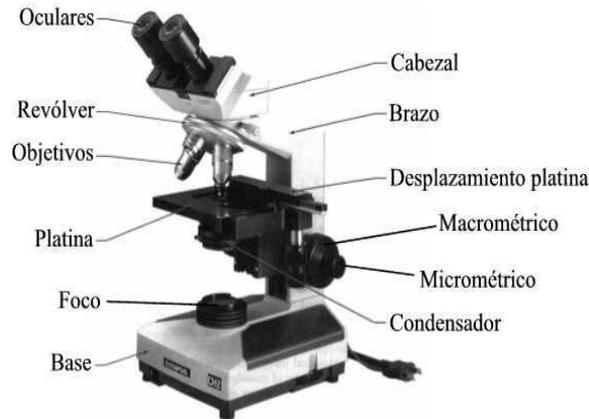
### **2.1.- PARTES DEL MICROSCOPIO**

Un microscopio consta de dos partes, sistema óptico y sistema mecánico

- Sistema óptico
  - ocular: lente situada cerca del ojo del observador. amplía la imagen del objetivo.
  - objetivo: lente situada cerca de la preparación. amplía la imagen de ésta.
  - condensador: lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.
  - diafragma o iris : regula la cantidad de luz que entra en el condensador.
  - foco: dirige los rayos luminosos hacia el condensador.
- Sistema mecánico

Se subdivide en dos partes: sistema de soporte o estativo y sistema de ajuste.

  - sistema de soporte o estativo:
    - pie; es la base del microscopio
    - brazo, une el pie con el tubo
    - tubo, en sus extremos se encuentran alojados oculares y objetivos
    - platina, es una placa horizontal que sostiene las preparaciones a observar.
  - sistema de ajuste
    - anillo, ajuste de los oculares
    - tornillo de ajuste , macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico que consigue el enfoque correcto
    - tornillo de elevación del condensador, se utiliza para aumentar la iluminación o para reducirla.
    - palanca de cierre del diafragma, se emplea para reducir o aumenta el valor de entrada de luz.
    - regulador de intensidad de lámpara



Partes de un microscopio óptico

## 2.2.- TIPOS DE MICROSCOPIO

Dependiendo de la fuente energética que utilizan, se pueden distinguir dos tipos de microscopios:

- microscopio óptico o fotónico, utilizan la luz como fuente energética.
- microscopio electrónico, emplean un haz de electrones.

### 2.2.1.- MICROSCOPIO ÓPTICO O FOTÓNICO

Este tipo de microscopios utilizan la luz como fuente de energía y las propiedades de los lentes ópticos que permiten aumentar el tamaño de los objetos observados. El microscopio óptico más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta quince veces. Por lo general se utilizan microscopios compuestos que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores. Algunos microscopios ópticos pueden aumentar un objeto por encima de las 2000 veces. Dentro de los microscopios fotónicos existen varios tipos, distinguidos por pequeñas diferencias, aunque el principio básico de funcionamiento es el mismo

- microscopio de campo claro o compuesto, es el microscopio más comúnmente usado, consiste en dos sistemas de lentes, el objetivo y el ocular, montados en extremos opuestos de un tubo cerrado. El objetivo está compuesto de varias lentes que crean una imagen real aumentada del objeto examinado. Las lentes de los microscopios están dispuestas de forma que el objetivo se encuentra en el punto focal del ocular. El aumento total del microscopio depende de las longitudes focales de los dos sistemas de lentes. La muestra que se va a observar debe ser teñida con algún colorante que permita hacerla destacar sobre el fondo claro o brillante que proviene de la fuente luminosa.
- microscopio de campo oscuro permite el estudio de las partes internas de la muestra, para lo cual ésta debe de ser dispuesta en una fina capa que pueda ser

atravesada por la luz. El campo microscópico está intensamente iluminado y los objetos estudiados se ven mas oscuros en él.

- microscopio de fase  
consta de un dispositivo, situado dentro o debajo del condensador, que produce una diferencia de un cuarto de longitud de onda en unos rayos luminosos con respecto a otros. Esto origina unas variaciones de luminosidad en los elementos estudiados, que permite diferenciarlos del resto de la muestra y observar con mayor detalle su estructura interna.
- microscopio de fluorescencia  
se define fluorescencia como la capacidad de ciertas sustancias de emitir, cuando son iluminadas por una radiación corta, una radiación mas larga. El microscopio de fluorescencia consta de una fuente de luz potente que emite una radiación que bien incide en la muestra, tras atravesar un condensador de campo oscuro (iluminación transmitida) o penetrar en el tubo del microscopio formando un ángulo recto con él, para posteriormente incidir en la muestra (iluminación incidente o epi-iluminación)
- microscopio petrográfico o de polarización
- microscopio de luz ultravioleta
- microscopio de campo cercano

### 2.2.2.- MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

Los principios básicos de los microscopios electrónicos son similares a los microscopios ópticos, las diferencias están dadas en la fuente de luz (electrones ) y en el tipo de lente, ya que los electrónicos emplean lentes electromagnéticas. La gran diferencia de los dos tipos de microscopios es la potencia que tiene cada cual, ya que el microscopio óptico es capaz de aumentar unas 2000 veces y una resolución de 0,2 micrones ( 0,0001 mm. ) mientras que el electrónico aumenta hasta un 1000000 de veces con una resolución de 0.1 nanómetros ( 0,0000001 mm.).

Todos los microscopios electrónicos cuentan con varios elemento básicos, disponen de un cañón de electrones que emite los electrones que chocan contra la muestra, creando una imagen aumentado. Se utilizan lentes electromagnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, junto con un sistema de vacío al interior del microscopio, para que las moléculas de aire no desvíen los electrones

- Microscopio electrónico de transmisión (TEM), se utiliza para ver secciones o cortes de tejidos, dirige un haz de electrones hacia el objeto que 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 TEM debe cortarse la muestra en capas finas con un grosor entre 50 a 200 nanómetros. Dicha muestra se coloca en una redecilla que se introduce en el tubo con una pieza alargada que se introduce por un lateral. Para el funcionamiento de este microscopio se utiliza un haz de electrones, obtenido desde una lámpara especial de tungsteno. El tubo tiene vacío en su interior, para impedir que nada dificulte el paso de los electrones. Un fallo en este vacío ocasiona la aparición de cuerpos extraños en el visor. Luego de ser enfocados por las lentes electromagnéticas, los electrones inciden sobre la muestra, formando la imagen que se obtiene en blanco y negro, la cual puede proyectarse sobre una pantalla especial o película fotográfica. El TEM examina partes grandes de la muestra. Éste microscopio obtiene imágenes en dos dimensiones, que luego pueden ser plasmadas en fotografías si interesa. Éste es el tipo de microscopio electrónico más utilizado en investigación, ya que obtiene muy buenos resultados y tiene gran potencia.

- Microscopio electrónico de barrido (SEM), este permite la observación de superficies sin la necesidad de realizar cortes microscópicos, explorando la superficie de la imagen punto por punto. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones, de forma parecida al barrido de un haz de electrones por la pantalla de una televisión.

Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios, ambos son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados de la muestra. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. Como consecuencia del barrido electrónico se genera una imagen con apariencia tridimensional, que permite estimar parámetros celulares como tamaño y forma, dándole ventajas en este sentido sobre el TEM. Las desventajas del SEM es su menor capacidad de aumento ya que sólo puede a unas 100000 veces y también tiene una resolución 1000 veces menor que el TEM. Eso y que sólo permite ver el exterior de la muestra.

- Microscopio sonda de barrido
- Microscopio de túnel de barrido
- Microscopio de fuerza atómica

### **3.- PROPIEDADES DE LA LUZ**

#### **3.1. REFLEXION**

Cuando la luz refleja de una superficie lisa, la onda ligera entrante se refiere como onda del incidente, y la onda que se despiden lejos de la superficie se llama la onda reflejada. La luz blanca visible que se dirige sobre la superficie de un espejo en ángulo (incidente) es reflejada nuevamente dentro de espacio por la superficie del espejo a otro ángulo (reflejado) que es igual al ángulo del incidente, según lo presentado en la clase particular para la acción de una onda ligera sinusoidal en un espejo liso, plano. Así, el ángulo de la incidencia es igual al ángulo de la reflexión para la luz visible así como para el resto de las longitudes de onda del espectro electromagnético de la radiación. Este concepto a menudo se llama la ley de la reflexión. Es importante observar que la luz no está separada en sus colores componentes porque no está estando "doblada" o refractado, y todas las longitudes de onda se están reflejando a los ángulos iguales. Las mejores superficies para la luz de reflejo son muy lisas, por ejemplo un espejo de cristal o metal pulido, aunque casi todas las superficies reflejarán la luz a un cierto grado

#### **3.2.- REFRACCION**

La refracción ocurre mientras que la luz pasa a partir de un medio a otro solamente cuando hay una diferencia en índice de refracción entre los dos materiales. Los efectos de la refracción son responsables de una variedad de fenómenos familiares, tales como la flexión evidente de un objeto que se sumerja parcialmente en agua y los espejismos observados en un desierto seco, arenoso. La refracción de la luz visible es también una característica importante de lentes que les permite enfocar un haz de luz sobre un solo punto.

El índice de refracción de una sustancia o de un material transparente se define mientras que la velocidad relativa a la cual la luz se mueve a través del material con respecto a su velocidad en un vacío. Por la convención, el índice de refracción de un vacío es definido como teniendo un valor de 1,0, que sirve como punto de referencia universal aceptado. Índice de refracción de otros materiales transparentes, identificada comúnmente por la n variable, se define con la ecuación:

$$n \text{ (índice de refracción)} = c/v$$

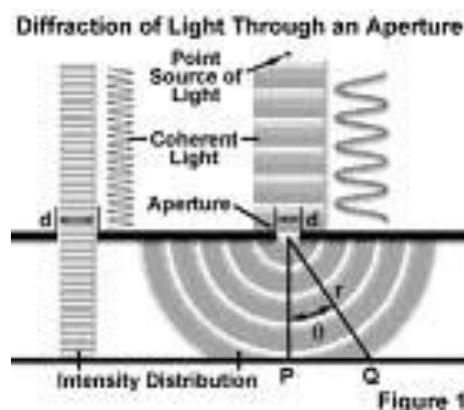
donde está "c" la velocidad de la luz en un vacío y un v es la velocidad de la luz en el material. Porque el índice de refracción de un vacío se define como 1,0, y la luz logra su velocidad máxima en un vacío (que sea desprovisto de cualquier material), el índice de

refracción de el resto de los materiales transparentes excede el valor de 1,0, y se puede medir por un número de técnicas.

### 3.3.- DIFRACCION

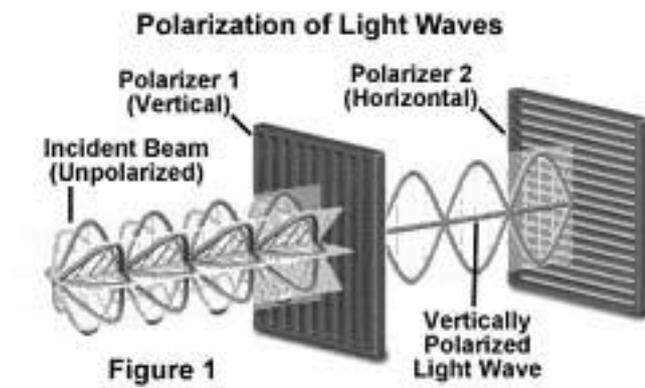
Varios de los experimentos clásicos y de la mayoría fundamentales que ayudan a explicar la difracción de la luz primero fueron conducidos entre los últimos decimoséptimos y temprano diecinueveavo siglos por el científico Francesco Grimaldi italian, el científico francés Augustin Fresnel, los jóvenes ingleses de Thomas del físico, y varios otros investigadores. Estos experimentos implican la propagación de ondas ligeras aunque una raja muy pequeña abertura, y demuestran que cuando la luz pasa a través de la raja, el tamaño físico de la abertura se determina cómo la abertura obra recíprocamente con la luz.

Si la longitud de onda de la luz es mucho más pequeña que la anchura de la abertura o de la raja, una onda ligera viaja simplemente hacia adelante en una línea recta después de pasar a través, como si no hay abertura presente cuadro . Sin embargo, cuando la longitud de onda excede el tamaño de la abertura, la difracción de la luz ocurre, causando la formación de un patrón de difracción que consiste en una porción central brillante ( **el máximo primario** ), limitada de cualquier lado por una serie de máximos secundarios separados por las regiones oscuras ( **mínimos** ). Los máximos y los mínimos son creados por la interferencia de ondas ligeras difractadas. Cada venda brillante sucesiva se convierte en procedimiento menos intenso hacia fuera, lejos del máximo central. La anchura de la porción brillante central, y el espaciamiento de las bandas laterales de acompañamiento, depende del tamaño de la abertura y de la longitud de onda de la luz.



### 3.4.- POLARIZACION

El ojo humano carece la capacidad de distinguir entre la luz aleatoriamente orientada y polarizada, y la luz plano-polarizada se puede detectar solamente con un efecto de la intensidad o del color, por ejemplo, por fulgor reducido al usar los cristales polarizados del sol. En efecto, los seres humanos no pueden distinguir entre las imágenes verdaderas del alto contraste observadas en un microscopio ligero polarizado y las imágenes idénticas de los mismos especímenes capturados digital (o en la película), y después proyectados sobre una pantalla con la luz que no se polariza.



### 3.5.- BIRREFRINGENCIA

La birrefringencia se define formalmente como la refracción doble de la luz en un material transparente, molecular pedido, que es una manifestación de la existencia de diferencias orientación-dependientes en el índice de refracción. Muchos sólidos transparentes son ópticamente isotrópicos, significando que índice de refracción es igual en todas las direcciones a través del enrejado cristalino. Los ejemplos de sólidos isotrópicos son sal de cristal, de la tabla, muchos polímeros, y una variedad amplia de compuestos orgánicos e inorgánicos.

## **4.- CONCEPTOS BASICOS DE MICROSCOPIA OPTICA**

Los microscopios son instrumentos diseñados para producir imágenes visuales o fotográficas magnificadas de objetos pequeños. El microscopio debe lograr tres

- que en las tareas produzca una imagen magnificada del espécimen
- separe los detalles en la imagen
- haga los detalles visibles al ojo o a la cámara fotográfica humano.

Este grupo de instrumentos incluye no solamente diseños de la múltiple-lente con objetivos y condensadores, pero también los solos dispositivos muy simples de la lente que son a menudo "hand-held" , por ejemplo una lupa.

### **4.1.- AMPLIACION**

Un microscopio o una lupa simple (lente) produce una imagen del objeto sobre el cual se enfoca el microscopio o la lupa. Las lentes simples de la lupa son biconvexas, significando ellas son más gruesas en el centro que en la periferia según lo ilustrado con la lupa en el cuadro 1. La imagen es percibida por el ojo como si estuviera en una distancia de 10 pulgadas o de 25 centímetros ( la referencia , o distancia tradicional o convencional de la visión).

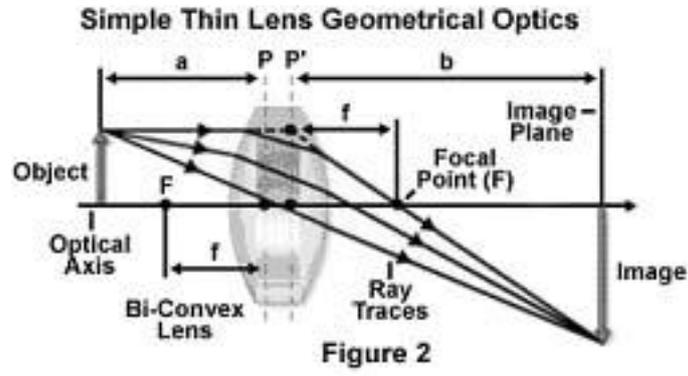
### **4.2. LENTES.**

La lente del término es el nombre común dado a un componente del material plástico de cristal o transparente, generalmente circular en el diámetro, que tiene dos superficies primarias que se muelan y se pulan de una manera específica diseñada para producir una convergencia o la divergencia de la luz que pasa a través del material. El microscopio óptico forma una imagen de un espécimen puesto en la etapa pasando la luz del iluminador con una serie de lentes de cristal y enfocando esta luz en los oculares, en el plano de la película en un sistema tradicional de la cámara fotográfica, o sobre la superficie de un sensor de la imagen digital.

#### **4.2.1.- TIPOS DE LENTES**

Cada lente tiene dos planos principales y dos planos focales que sean definidos por la geometría de la lente y de la relación entre la lente y la imagen enfocada. Los rayos ligeros que pasan a través de la lente se intersectarán y se unen físicamente en el plano focal ,mientras que las extensiones de los rayos que entran en la lente se intersectarán en el plano principal con las extensiones de los rayos que emergen de la lente. La longitud focal de una lente se define como la distancia entre el plano principal y el plano focal, y cada

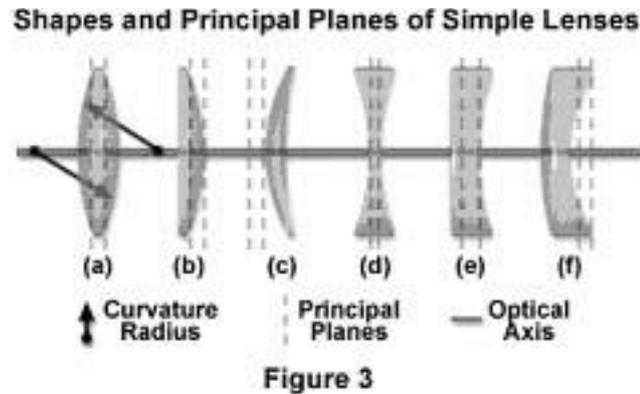
lente tiene un sistema de estos planos en cada lado (delantero y posterior).



El objeto (o el espécimen) que es reflejado por la lente se coloca en el plano del objeto, situado en el lado izquierdo de la lente por la convención, y es representado por una flecha roja que viaja hacia arriba de la línea central o del eje óptico, que pasa a través del centro de la lente, perpendicular a los planos principales. Irradie los rastros a través de la lente (flechas amarillas) emanan del objeto y proceden de izquierda a derecha a través de la lente a formar una imagen verdadera magnificada (flecha roja invertida) en el plano de imagen en el lado derecho de la lente. La distancia entre el plano principal delantero de la lente y del espécimen se conoce como la distancia del objeto, y es representada por la variable "a". De una manera similar, la distancia del plano principal posterior a la imagen variable "b" se llama la distancia de la imagen. Estos parámetros son los elementos fundamentales que definen la óptica geométrica de una lente simple y se pueden utilizar calcular las características importantes de la lente, incluyendo factor focal de la longitud y de la ampliación.

Las lentes pueden ser el depender positivo o negativo sobre si causan los rayos ligeros que pasan a través para converger en un solo punto focal, o divergen hacia fuera del eje óptico y en espacio. Lentes positivas convergen los rayos ligeros del incidente que son paralelos al eje óptico y los enfocan en el plano focal para formar una imagen verdadera. Según lo demostrado las lentes positivas tienen una o dos superficies convexas y son más gruesas en el centro que en los bordes. Una característica común de lentes positivas es que magnifican objetos cuando se colocan entre el objeto y el ojo humano. En contraste, las lentes negativas divergen los rayos ligeros del incidente paralelo y forman una imagen virtual extendiendo los rastros de los rayos ligeros que pasan a través de la lente a un punto focal detrás de la lente. Las lentes negativas tienen por lo menos una superficie cóncava y son más finas en el centro que en los bordes Cuando una lente negativa se coloca entre un objeto y el ojo, no

forma una imagen verdadera, sino reduce (o desmagnifica ) el tamaño evidente del objeto formando una imagen virtual.



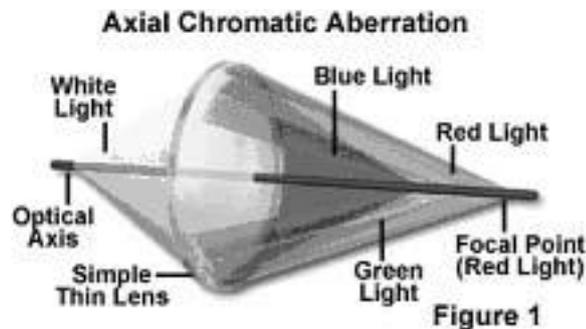
#### 4.2.2.- ABERRACIONES DE LENTES.

Los microscopios y otros instrumentos ópticos son plagados comúnmente por los errores de la lente que tuercen la imagen por una variedad de mecanismos asociados a los defectos (designados comúnmente aberraciones) que resultan de la geometría esférica de las superficies de la lente. Hay tres fuentes primarias de la acción no-ideal de la lente (errores) que se observan en el microscopio. De las tres clases principales de los errores de la lente, dos se asocian a la orientación frentes de onda y los planos focales con respecto al eje óptico del microscopio. Éstos incluyen errores de la lente del en-eje tales como aberración cromática y esférica, y los errores principales del apagado-eje manifestados como coma , el astigmatismo , y curvatura del campo . Una tercera clase de aberraciones, considerada comúnmente en los stereomicroscopes que tienen sistemas de la lente de zumbido, es la distorsión geométrica, que incluye la distorsión del barril y distorsión del acerico.

##### 4.2.2.1.- ABERRACIÓN CROMÁTICA

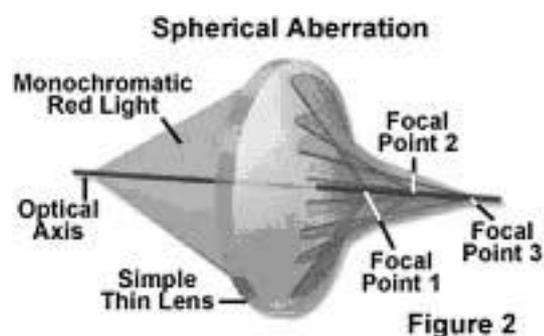
Una de las averías más comunes observadas en lentes esféricas, aberración cromática ocurre porque la lente refracta los varios colores presentes en la luz blanca a un diverso ángulo según la longitud de onda. La luz roja no se refracta al mismo ángulo que luz verde o azul así que el punto focal en el eje óptico de la lente es más lejano lejos de la lente para la luz roja. Asimismo, la luz verde se enfoca más cercano a la lente que luz roja, y la luz azul se enfoca en un plano que esté el más cercano a la lente. Este fenómeno se refiere como dispersión y ocurre comúnmente a cierto grado en todos los elementos esférico formados de la lente. La inhabilidad de la lente de traer a todos los colores en resultados planos focales comunes en un tamaño levemente diverso de la imagen y un punto focal para cada uno de los tres grupos predominantes de la longitud de onda. El

resultado es una franja o un halo coloreada que rodea la imagen, con el color del halo cambiando pues el punto focal del objetivo se varía.



#### 4.2.2.2.- ABERRACIÓN ESFÉRICA

Un artefacto potencialmente serio que puede tener consecuencias serias en las imágenes producidas por el microscopio, aberración esférica es el resultado de usar las lentes que tienen superficies esféricas, que es actualmente el único acercamiento práctico al diseño de la lente. La aberración esférica ocurre cuando las ondas ligeras que pasan con la periferia de una lente no se traen en foco exacto con éstos que pasan a través del centro. El resultado es que no existe un plano de imagen bien definido, y el espécimen no puede ser enfocado correctamente. Como ejemplo, una fuente del punto de la luz aparece como punto rodeado por un halo o una serie brillante de anillos de la difracción cuando el microscopio se trae en su "mejor" foco.



La corrección de un sistema óptico (tal como un microscopio) para la aberración esférica es lograda a menudo utilizando una combinación de los elementos positivos y negativos de la lente con diverso grueso, que se cementan juntos para formar un grupo compuesto de la lente. Las aberraciones esféricas son muy importantes en los términos de la resolución de una lente porque

afectan la proyección de imagen coincidente de puntos a lo largo del eje óptico y degradan el funcionamiento de la lente, que afectará seriamente agudeza y claridad del espécimen. Estos defectos de la lente pueden ser reducidos con frecuencia limitando los bordes externos de la lente de la exposición a la luz usando diafragmas, y también utilizando la lente esférica emerge dentro del sistema óptico.

#### 4.2.2.3.- COMA

Similar a la aberración esférica en muchos aspectos, coma se encuentra con los rayos ligeros del apagado-eje y es generalmente el más severo cuando el microscopio está fuera de alineación apropiada. La aberración se nombra para su semejanza fuerte a la forma de una cola del cometa, y es manifestada por una raya de la luz que aparece emanar de un punto enfocado en la periferia del campo de visión. La forma distinta exhibida por las imágenes que sufren de la aberración del coma es el resultado de las diferencias de la refracción por los rayos ligeros que pasan con las varias zonas de la lente pues el ángulo del incidente llega a ser más oblicuo (apagado-eje). La severidad de la aberración cromática es una función de la forma fina de la lente. En extremo, el coma da lugar a los rayos meridionales que pasan con la periferia de la lente para llegar el plano de imagen más cercano al eje que los rayos ligeros que pasan a través de la porción central de la lente

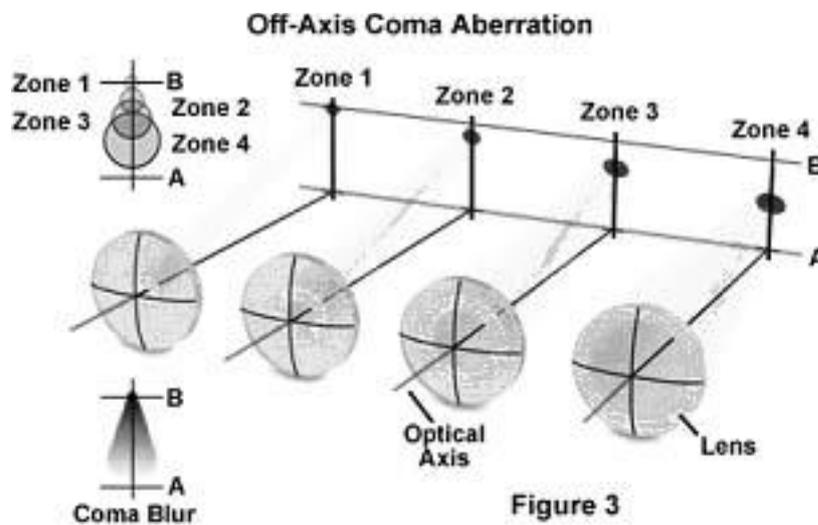


Figure 3

#### 4.2.2.4.- ASTIGMATISMO

La aberración del astigmatismo es similar al coma; sin embargo, este artefacto no está como sensible al tamaño de la abertura y no depende más fuertemente del ángulo oblicuo del rayo de luz. La aberración es manifestada por la imagen del apagado-eje de un punto del espécimen que aparece como una línea o elipse en vez de un punto discreto. Dependiendo del ángulo de los rayos ligeros

del apagado-eje que entran en la lente, la imagen de la línea se puede orientar en de dos diversas direcciones, tangencial ( meridional ) o sagital ( ecuatorial ). El cociente de la intensidad de la imagen de la unidad disminuirá, con la definición, el detalle, y el contraste siendo perdido como la distancia del centro se aumenta.

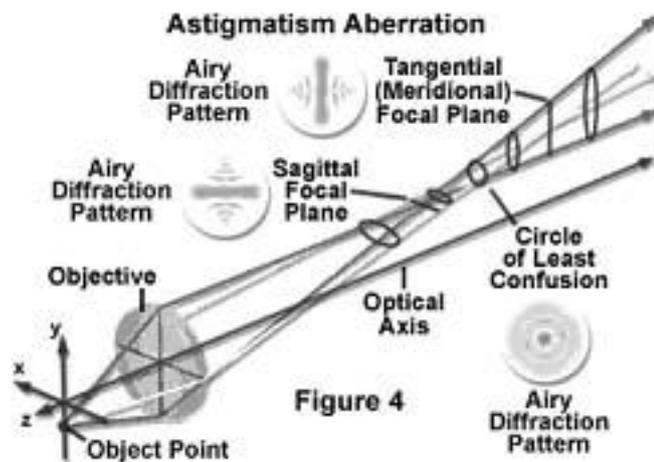


Figure 4

#### 4.2.2.5.- CURVATURA DE CAMPO

La curvatura de campo en el plano focal es la misma que la correspondiente a los componentes ópticos de donde procede, si estos tienen una relación focal corta, la curvatura de campo es mucho más pronunciada.

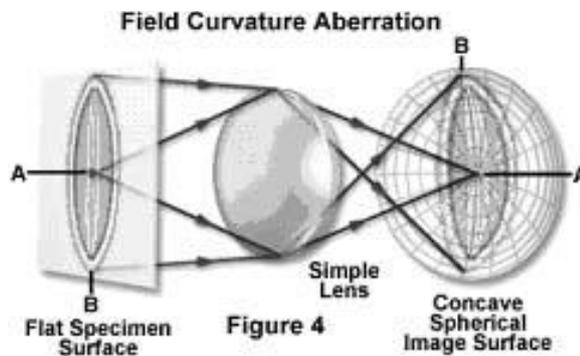


Figure 4

### 4.3.- OBJETIVOS DEL MICROSCOPIO

Los objetivos del microscopio son quizás los componentes más importantes de un microscopio óptico porque son responsables de la formación primaria de la imagen y desempeñan un papel central en la determinación de la calidad de las imágenes que el microscopio es capaz de producir. Los objetivos son también instrumentales en la determinación de la ampliación de un espécimen particular y de la resolución bajo los cuales el detalle fino del espécimen se pueda observar en el microscopio. El objetivo es el componente más difícil de un microscopio óptico a diseñar y a montar, y es el primer componente que la luz encuentra mientras que procede del espécimen al plano de imagen. Los objetivos derivan su nombre del hecho de que son, por proximidad, el componente más cercano al objeto que es reflejado.

Tres características críticas del diseño del objetivo fijaron el último límite de la resolución del microscopio

- la longitud de onda de la luz usada para iluminar
- la abertura angular del cono ligero capturado por el objetivo
- índice de refracción en el espacio del objeto entre la lente delantera objetiva

La resolución para un microscopio óptico se puede describir como la distancia perceptible mínima entre dos puntos de cerca espaciados del espécimen:

$$R = \lambda / 2n(\sin(\theta))$$

donde está la distancia R de la separación,  $\lambda$  es la longitud de onda de la iluminación, n es el índice de refracción del medio de la proyección de imagen, y  $\theta$  es una mitad de la abertura angular objetiva. En examinar la ecuación, llega a ser evidente que la resolución es directamente proporcional a la longitud de onda de la iluminación.

El ojo humano responde a la región de la longitud de onda entre 400 y 700 nanómetros, que representa el espectro ligero visible que se utiliza para una mayoría de observaciones del microscopio. La resolución es también dependiente sobre el índice de refracción del medio de la proyección de imagen y de la abertura angular objetiva.

La abertura numérica es generalmente el criterio más importantes del diseño (con excepción de la corrección óptica) a considerar al seleccionar un objetivo del microscopio. Los valores se extienden a partir de la 0,1 para los objetivos muy bajos de la ampliación (1x a 4x) tanto como a 1,6 para los objetivos de alto rendimiento que utilizan los aceites especializados de la inmersión.

Mientras que los valores numéricos de la abertura aumentan para una serie de objetivos de la misma ampliación, observamos una mayor capacidad de luz-acopio y aumentamos generalmente de la resolución.

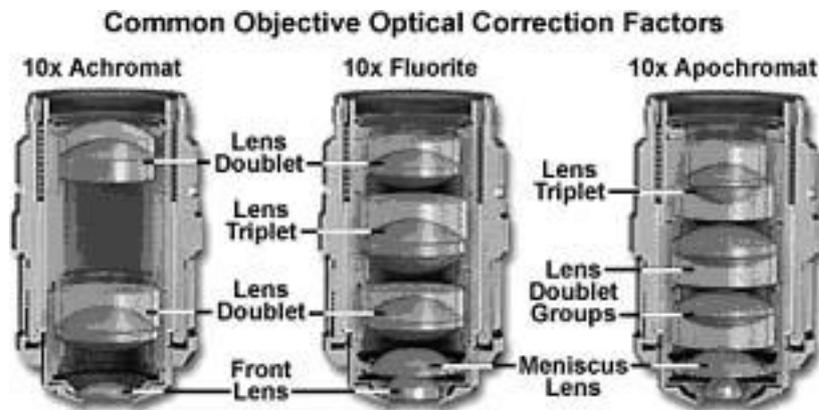


Figure 2

Además, los objetivos acromáticos se corrigen para la aberración esférica en el verde del tabla. La corrección limitada de objetivos acromáticos puede conducir a los artefactos substanciales cuando los especímenes son examinados y reflejados con microscopia y fotomicrografía del color.

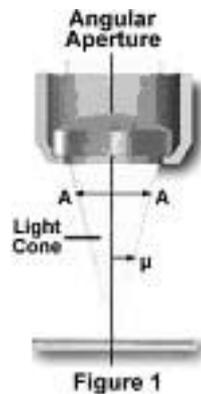
Si el foco se elige en la región verde del espectro, las imágenes tendrán un halo rojizo-magenta (a menudo llamado color residual). Los objetivos acromáticos rinden sus mejores resultados con la luz pasada con un filtro verde (a menudo un filtro de interferencia) y usar la película negra y blanca cuando estos objetivos se emplean para la fotomicrografía. La carencia de la corrección para la llanura del campo (o de la curvatura del campo) obstaculiza más lejos objetivos del achromat.

El nivel más alto siguiente de la corrección y del coste se encuentra en los objetivos llamados las fluoritas o los semi-apochromats, nombrado para la fluorita mineral, que fue utilizada originalmente en su construcción. El cuadro representa las tres clases principales de objetivos: Los achromats con la menos cantidad de corrección, según lo discutido arriba; las fluoritas (o semi-apochromats) que tienen correcciones esféricas adicionales; y, los apochromats que son los objetivos lo más altamente posible corregidos disponibles

#### 4.3.1.- ABERTURA NUMÉRICA Y RESOLUCIÓN

La abertura numérica de un objetivo del microscopio es una medida de su capacidad de recolectar la luz y de resolver el detalle fino del espécimen en una distancia fija del objeto. Imagen-formando las ondas ligeras pasan a través del espécimen e incorporan el objetivo a un cono invertido. Una rebanada longitudinal de este cono de la luz

demuestra la abertura angular, un valor que sea determinado por la longitud focal del objetivo.



El ángulo  $\mu$  es una mitad de la abertura angular ( $\alpha$ ) y se relaciona con la abertura numérica con la ecuación siguiente :

$$\text{Abertura numérica ( NA )} = n(\sin \mu)$$

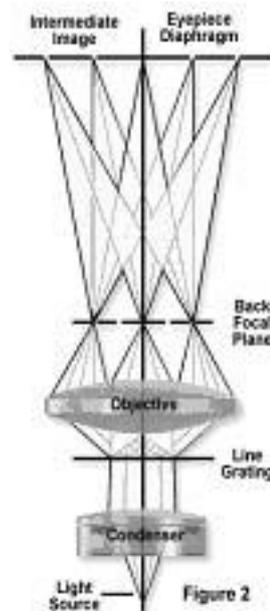
donde está el índice de refracción  $n$  del medio de la proyección de imagen entre la lente delantera del objetivo y del cristal de la cubierta del espécimen, un valor que se extiende a partir de 1,00 para el aire a 1,51 para la inmersión especializada engrasa. Muchos autores substituyen la variable  $\alpha$  para  $\mu$  en la ecuación numérica de la abertura. De esta ecuación es obvio que cuando el medio de la proyección de imagen es aire (con un índice de refracción, **una  $n = 1,0$** ), después la abertura numérica es dependiente solamente sobre el ángulo  $\mu$  que valor máximo es el  $90^\circ$ .

Examinando la ecuación numérica de la abertura, es evidente que el índice de refracción es el factor limitador en las aberturas numéricas de realización mayor de 1,0. Por lo tanto, para obtener aberturas numéricas de un funcionamiento más alto, el índice de refracción del medio entre la lente delantera del objetivo y el espécimen deben ser aumentados. Los objetivos del microscopio están disponibles ahora que permiten proyección de imagen en medios alternativos tales como agua (índice de refracción = 1,511,33), glicerina (índice de refracción = 1,47), y aceite de la inmersión (índice de refracción = 1,51).

#### 4.3.2.- FORMACIÓN DE LA IMAGEN

En el microscopio óptico, cuando la luz de la lámpara del microscopio pasa a través del condensador y entonces a través del espécimen (si se asume que el espécimen es un espécimen absorbente ligero), algo de la luz pasa alrededor y a través del espécimen imperturbado en su trayectoria. Tal luz se llama luz directa o desvío de la luz. Tal luz desviada (a que usted aprenderá posteriormente, llamada luz difractada) se rinde una mitad longitud

de onda o 180 grados fuera de paso (más comunmente, fuera de fase). La longitud de onda fuera de la fase causada por el espécimen sí mismo de una mitad permite a esta luz causar interferencia destructiva con la luz directa cuando ambas llegan el plano de imagen intermedio el diafragma del ocular. Puesto que nuestros ojos son sensibles a las variaciones en brillo, la imagen entonces se convierte en reconstitución más o menos fiel del espécimen original.



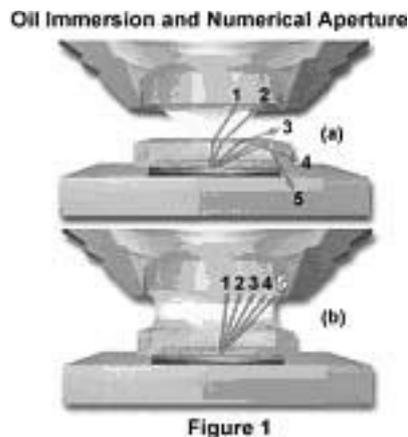
#### 4.3.3.- MEDIOS DE LA INMERSIÓN

La capacidad de un objetivo del microscopio de capturar rayos ligeros desviados sobre de un espécimen es dependiente la abertura numérica y el medio con el cual la luz viaja. La abertura numérica se relaciona con el medio de la proyección de imagen con la ecuación:

$$\text{Abertura numérica ( NA )} = n(\sin m)$$

El principio de la inmersión del aceite se demuestra en el cuadro 1 donde los rayos ligeros individuales se remontan a través del espécimen y pase en el objetivo o se refractan en otras direcciones. El cuadro 1(a) ilustra el caso de un objetivo seco con cinco rayos (etiquetados 1 a 5) demostrado pasar a través de una muestra que se cubre con una tira. Estos rayos se refractan en el interfaz del tira-aire y solamente los dos rayos más cercanos al eje óptico (los rayos 1 y 2) del microscopio tienen el ángulo apropiado para entrar en la lente delantera objetiva. El tercer rayo se refracta en ángulo de cerca de 30 grados a la tira y no incorpora el objetivo. Los dos rayos pasados (4 y 5) internamente se reflejan detrás a través de la tira y, junto con el tercer rayo, contribuyen a las reflexiones internas de la luz en las superficies de cristal que tienden degradan la resolución de la imagen.

Cuando el aire es substituido por el aceite del mismo índice de refracción que el cristal, demostrado en el cuadro 1(b), los rayos ligeros ahora pasa derecho a través del interfaz del cristal-aceite sin la desviación debido a la refracción. La abertura numérica es aumentada así en el factor **de n** , el índice de refracción del aceite.



#### 4.4.- OCULARES (OCULAR)

Los oculares funcionan conjuntamente con objetivos del microscopio para magnificar más lejos la imagen intermedia para poder observar detalles del espécimen. Los oculares son conocidos alternativo para los oculares que se ha utilizado extensamente en la literatura, pero mantener consistencia durante esta discusión que referiremos a todos los ocular como oculares. Los mejores resultados en microscopia requieren que los objetivos estén utilizados conjuntamente con los oculares que son apropiados a la corrección y al tipo de objetivo.

Los oculares también tendrán a menudo una designación de H, dependiendo del fabricante, para indicar un plano focal del alto punto del ojo que permita que los microscopistas usen los cristales mientras que el ver muestra. Otras inscripciones encontraron a menudo en los oculares incluyen:

- WF para el Ancho-Campo
- UWF para ultra el Ancho-Campo
- Interruptor y SWF para el Ancho-Campo estupendo
- ÉL para el alto punto del ojo
- CF para los oculares pensaron para el uso con objetivos corregidos los CF.

Los oculares que compensan están inscritos a menudo con K , C , o los compuestos así como la ampliación. Los oculares usados con objetivos del plano-campo a veces se etiquetan "Plan-Comp ."

Hay dos tipos importantes de oculares que se agrupan según el arreglo de la lente y del diafragma

- los oculares negativos con un diafragma interno
- oculares positivos que tienen un diafragma debajo de las lentes del ocular.

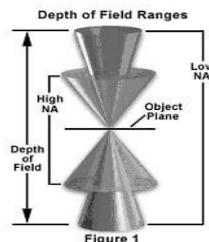
Los oculares negativos tienen dos lentes: la lente superior, que está la más cercana al ojo del observador, se llama la ojo-lente y la lente más baja (debajo del diafragma) a menudo se llama la lente del campo. En su forma más simple, ambas lentes son plano-convexas, con los lados convexos "haciendo frente" al espécimen. Aproximadamente a mitad de la distancia entre estas lentes hay una abertura circular fija o un diafragma interno que, por su tamaño, define el campo visual circular que se observa en mirar en el microscopio

## 5.- CONCEPTOS Y FÓRMULAS EN MICROSCOPIA

### 5.1.- PROFUNDIDAD DE CAMPO Y PROFUNDIDAD DE FOCO

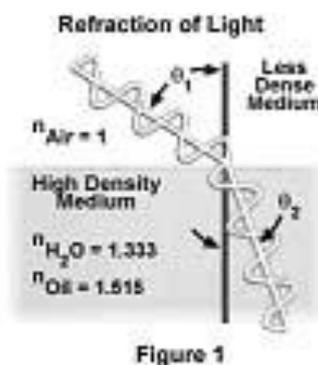
Al considerar la resolución en microscopia óptica, ponen a una mayoría del énfasis en punto a la resolución lateral del punto en el perpendicular del plano al eje óptico. Otro aspecto importante a la resolución es la energía de resolución axial ( o longitudinal) de un objetivo, que es paralelo medido al eje óptico y se refiere lo más a menudo posible como profundidad del campo.

La resolución axial, como la resolución horizontal, es determinada solamente por la abertura numérica del objetivo, con el ocular magnificando simplemente los detalles resueltos y proyectados en el plano de imagen intermedio. En microscopia la profundidad del campo es muy corta y medida generalmente en unidades de micrones. La profundidad del término del foco, que refiere al espacio de la imagen, se utiliza a menudo alternativamente con la profundidad del campo, que refiere al espacio del objeto.



### 5.2.- INDICE DE REFRACCION

Es un valor calculado del cociente de la velocidad de la luz en un vacío a eso en un segundo medio de la mayor densidad. La variable del índice de refracción es simbolizada lo más comúnmente posible por la letra **n** o **n'** en texto descriptivo y ecuaciones matemáticas.



Según lo presentado en la figura , un incidente del frente de onda sobre una superficie plana que separa dos medios se refracta sobre incorporar el segundo medio si la onda del incidente es oblicua a la superficie. El ángulo del incidente (  $n(1)$  ) es relacionado con el ángulo de la refracción (  $n(2)$  ) por la relación simple conocida como **ley de Snell**. Cuando  $n(1)$  es mayor de  $n(2)$  , el ángulo de la refracción es siempre más pequeño que el ángulo de la incidencia.

Alternativamente cuando  $n(2)$  es mayor de  $n(1)$  el ángulo de la refracción es siempre mayor que el ángulo de la incidencia. Cuando los dos índices refractivos son igual (  $n(1) = n(2)$  ), después la luz se pasa a través sin la refracción.

### **5.3.- RESOLUCION**

La resolución de un microscopio óptico se define como la distancia más corta entre dos puntos en un espécimen que se pueda todavía distinguir por el observador o el sistema de la cámara fotográfica como entidades separadas. La resolución es un valor algo subjetivo en microscopia óptica porque en la alta ampliación, una imagen se puede aparecer unsharp pero todavía resolver a la capacidad máxima del objetivo. La abertura numérica determina la energía de resolución de un objetivo, pero la resolución total del tren óptico del microscopio entero es también dependiente sobre la abertura numérica del condensador del substage. Cuanto más alta es la abertura numérica del sistema total, mejor es la resolución.

### **5.4.- CAMPO VISUAL**

El diámetro del campo en un microscopio óptico es expresado por el número del campo visual , o simplemente el número del campo , que es el diámetro del campo de la visión en los milímetros medidos en el plano de imagen intermedio. En la mayoría de los casos, el diámetro de la abertura del diafragma del campo del ocular determina el tamaño de campo de la visión. El tamaño de campo en el plano del espécimen entonces se define como el número del campo dividido por la ampliación del objetivo :

$$\text{Ampliación objetiva} \div \text{del tamaño de campo} = \text{del número del campo} \\ (\text{fn}) (\text{M o})$$

Si una lente auxiliar se inserta entre el objetivo y el ocular, el factor de la ampliación de esta lente se debe también emplear en la ecuación por la multiplicación con la ampliación objetiva (antes de la operación de la división). Aunque el número del campo es limitado generalmente por el tamaño del diafragma de la ampliación y del

campo (parada) del ocular, hay claramente un límite que también es impuesto por el diseño del sistema objetivo de la lente.

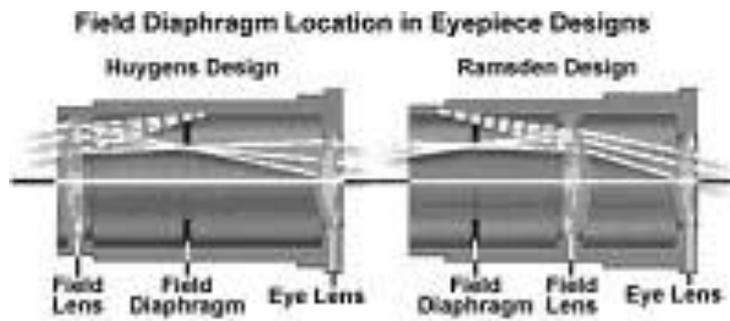


Figure 1

## **6.- MANEJO DEL MICROSCOPIO OPTICO Y MANTENIMIENTO**

### **6.1.- MANEJO DEL MICROSCOPIO OPTICO**

En el correcto empleo del microscopio óptico, se deben de seguir las siguientes pautas

- Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones.
- Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
- Comenzar la observación con el objetivo de 4x (ya está en posición) o colocar el de 10 aumentos (10x) si la preparación es de bacterias.
- Para realizar el enfoque:
  - Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
  - Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
- Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 3. El objetivo de 40x enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.
- Empleo del objetivo de inmersión:
  - Bajar totalmente la platina.
  - Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite.
  - Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de x40.
  - Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.

- Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.
- Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.
- Enfocar cuidadosamente con el micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.
- Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 3.
- Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica. Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

## **6.2.- MANTENIMIENTO**

- Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.
- Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.
- Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
- No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
- Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el

objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.

- No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
- El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular.
- Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en xilol.
- Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión práctica y, al acabar el curso, encargar a un técnico un ajuste y revisión general de los mismos.