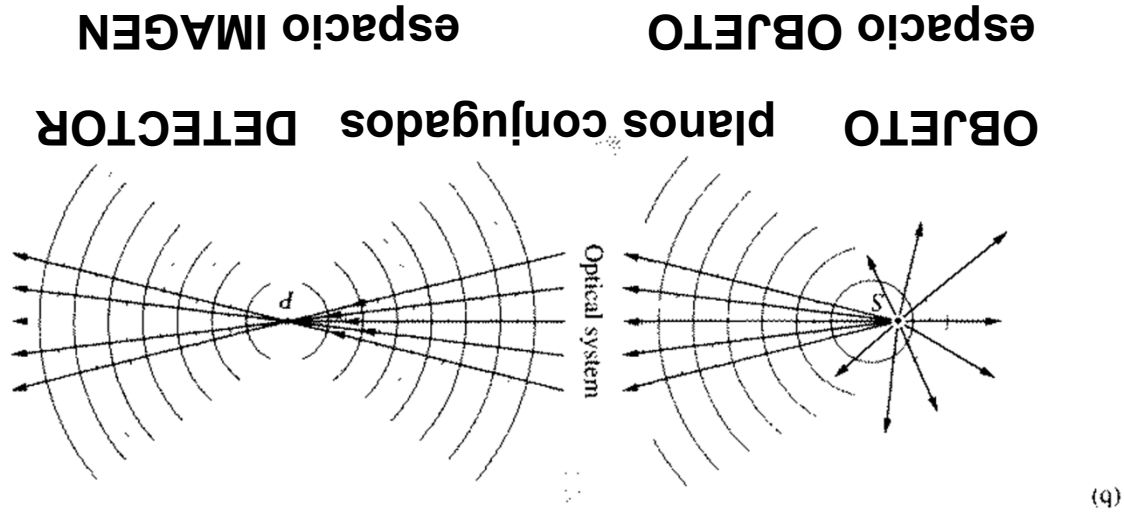
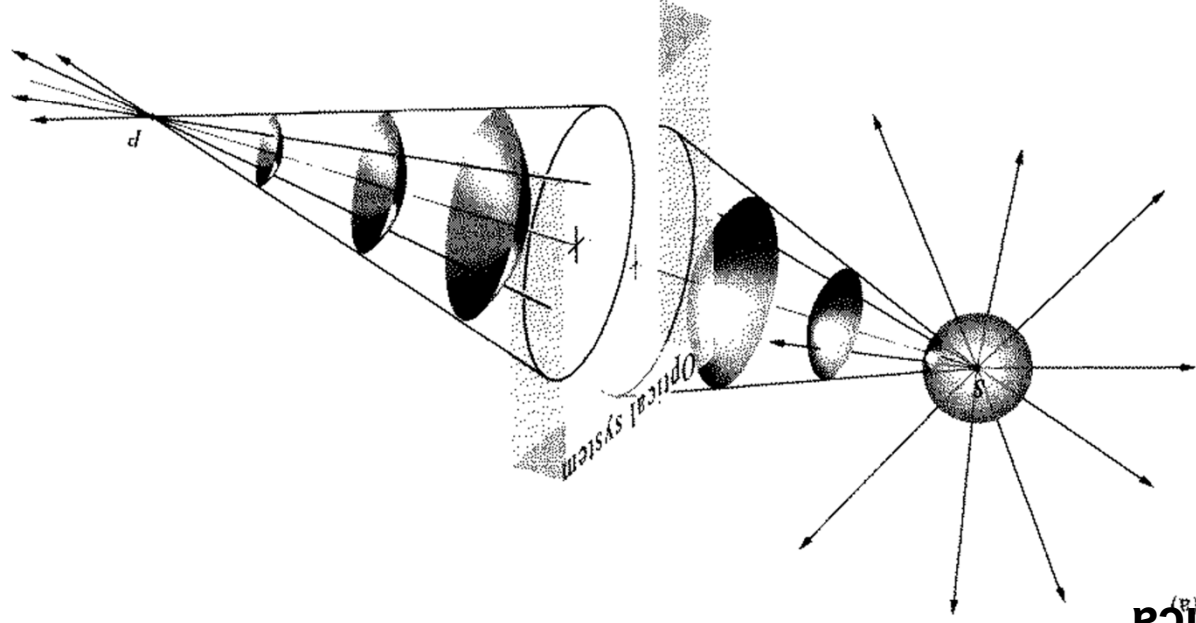


# **RESUMEN CLASE DE MICROSCOPIA**

# Microscopio

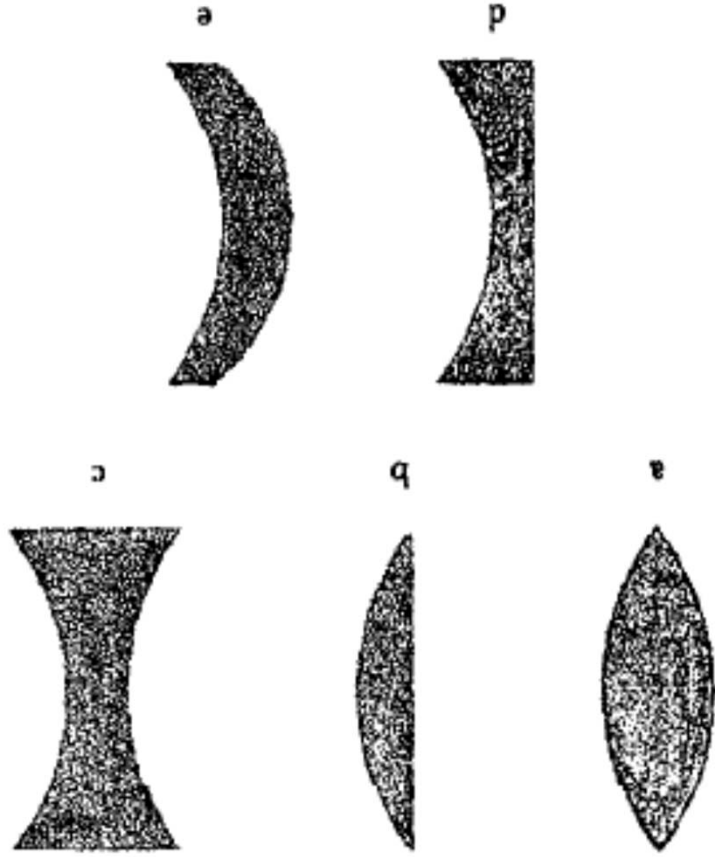
Óptica geométrica



**OBJETO planos conjugados DETECTOR**  
**espacio OBJETO**  
**espacio IMAGEN**  
**foco**

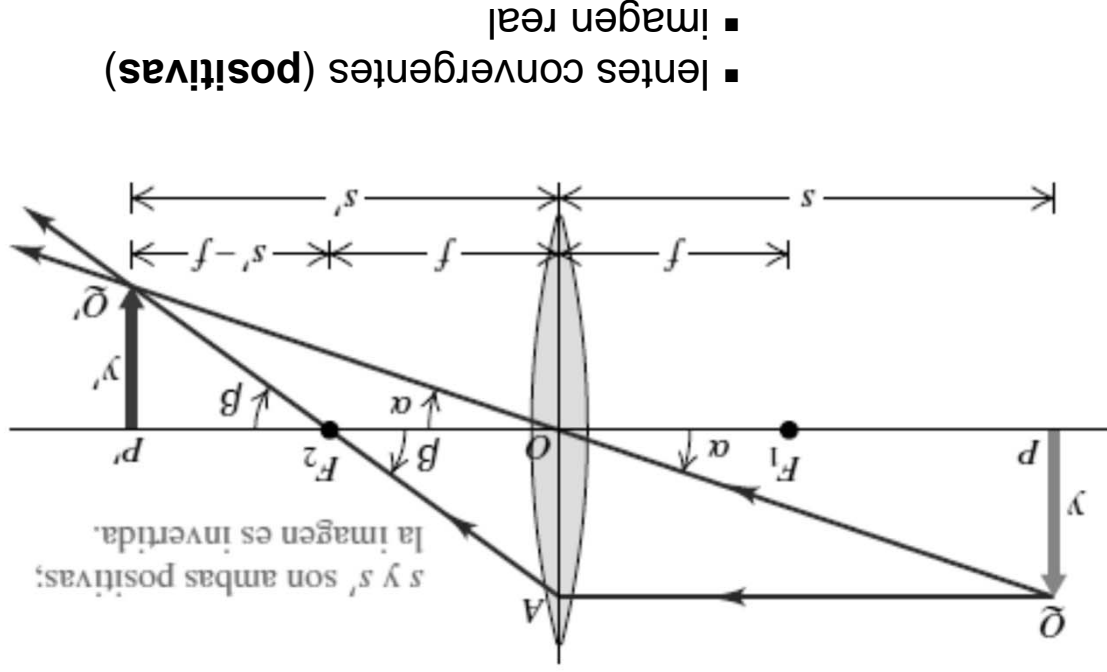
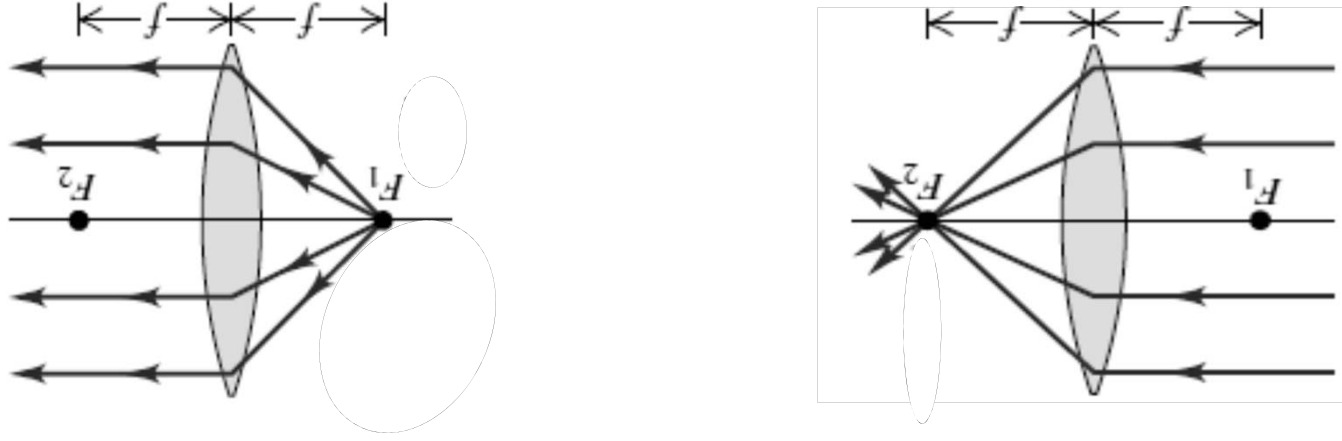
# Conceptos básicos: lentes delgadas

*Lente*: sistema óptico con dos superficies refractivas.



lentes convergentes (**positivas**) y divergentes (**negativas**)

# Conceptos básicos: lentes delgadas - propiedades



- lentes convergentes (positivas)
- imagen real

$$m = -\frac{s}{s'}$$

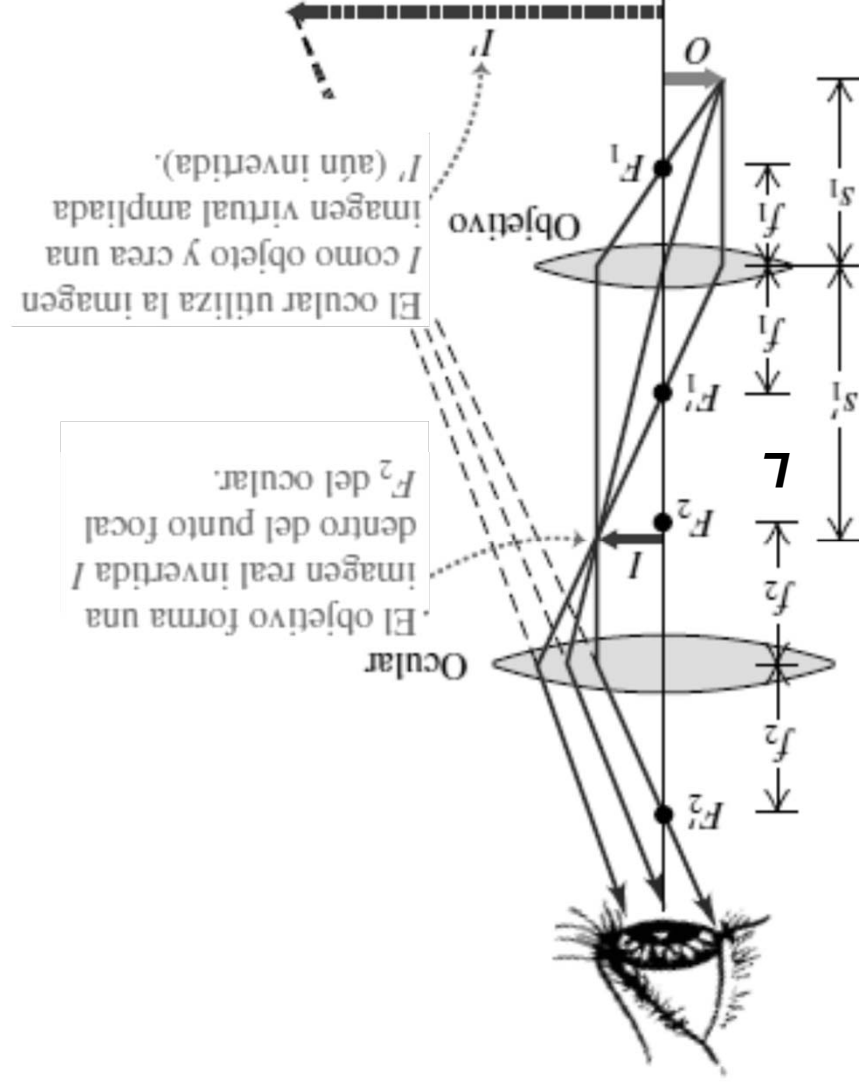
$$\frac{1}{f} = \frac{1}{s'} + \frac{1}{s}$$

# Conceptos básicos: microscopio - sistema de lentes

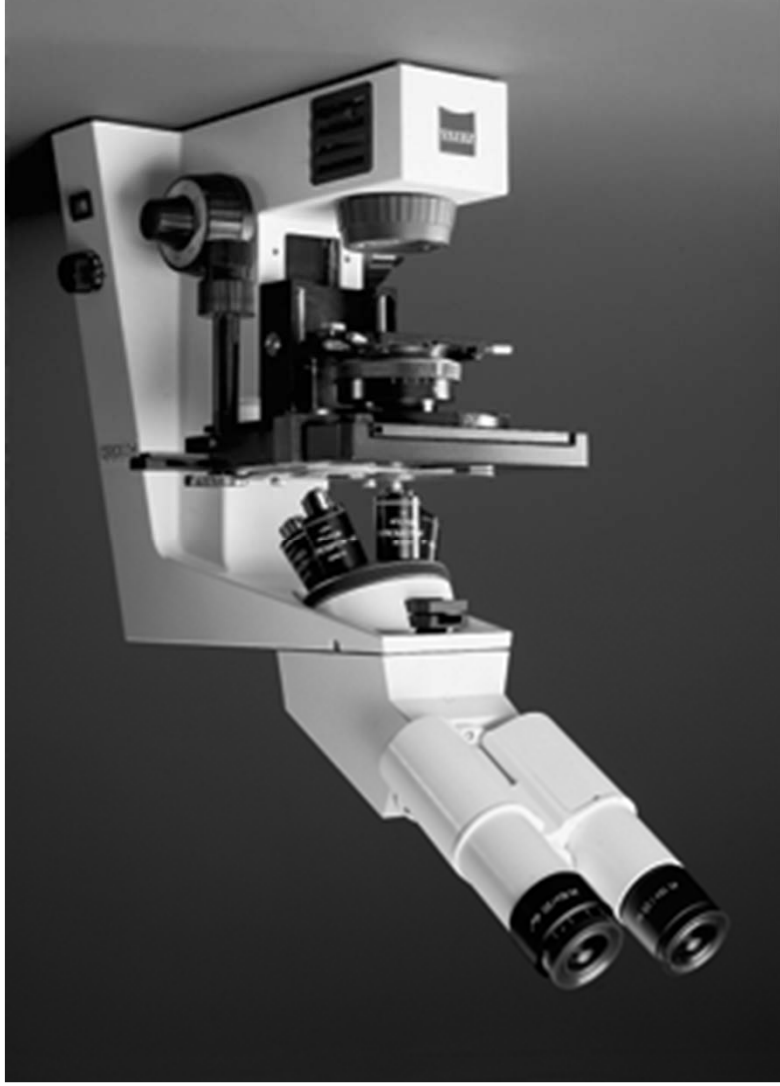
- $L$ , longitud del tubo
- el aumento *lateral*  $m_1$  del objetivo
- el aumento *angular*  $M_2$  del ocular

$$m_1 = -\frac{s'_1}{s_1} \quad M_2 = (25 \text{ cm})/f_2$$

$$M = m_1 M_2 = \frac{(25 \text{ cm})s'_1}{f_1 f_2}$$



## Conceptos básicos: microscopio - sistema de lentes



Esta constituido por cuatro grupos de dispositivos o sistemas articulados:

- Sistema mecánico

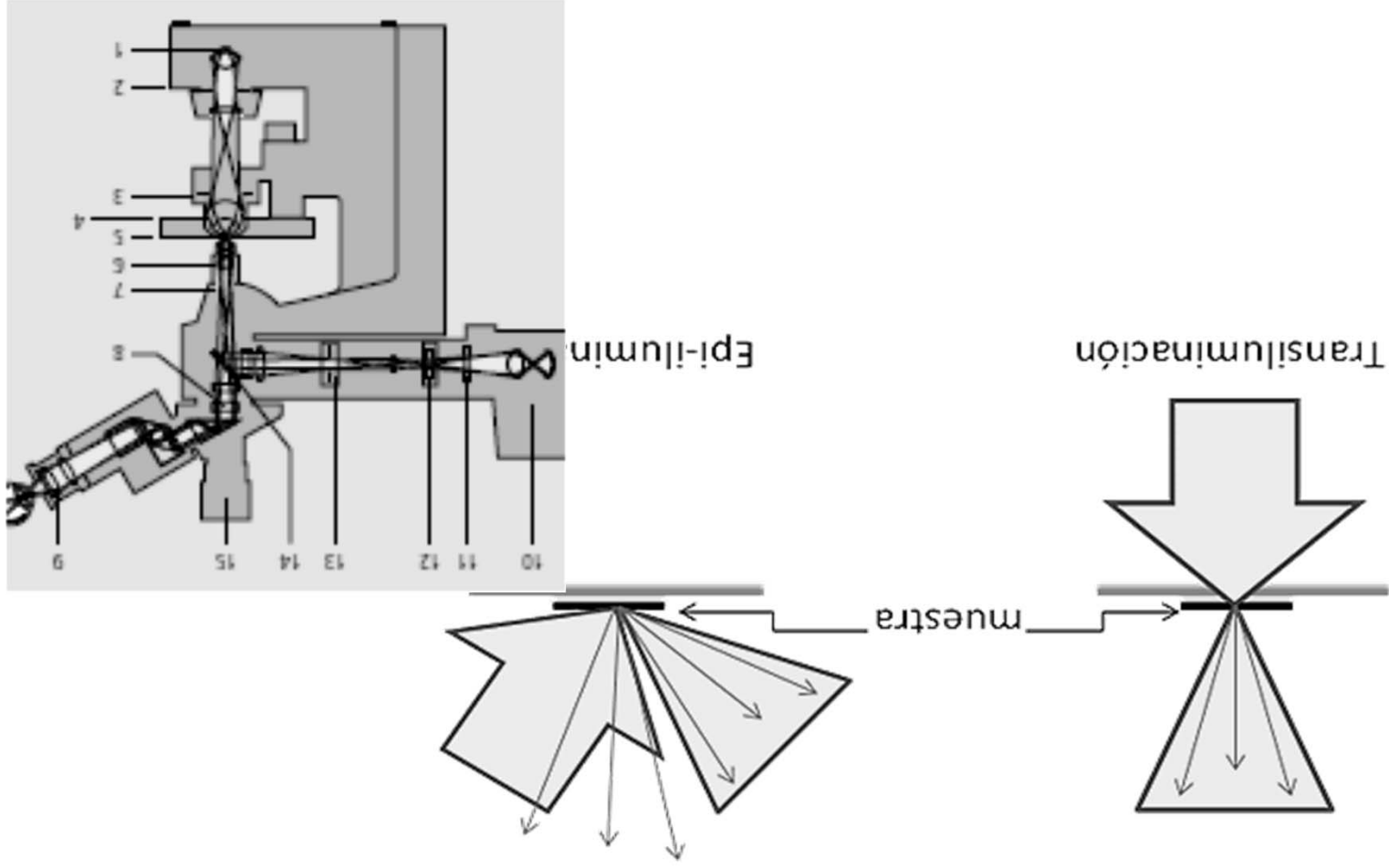
- Sistema óptico

- Sistema de iluminación

- Accesorios

# Conceptos básicos: iluminación

Para iluminar el objeto se pueden emplear dos mecanismos, ya sea que el rayo de luz lo atraviese o que simplemente incida en cierto ángulo sobre el objeto.



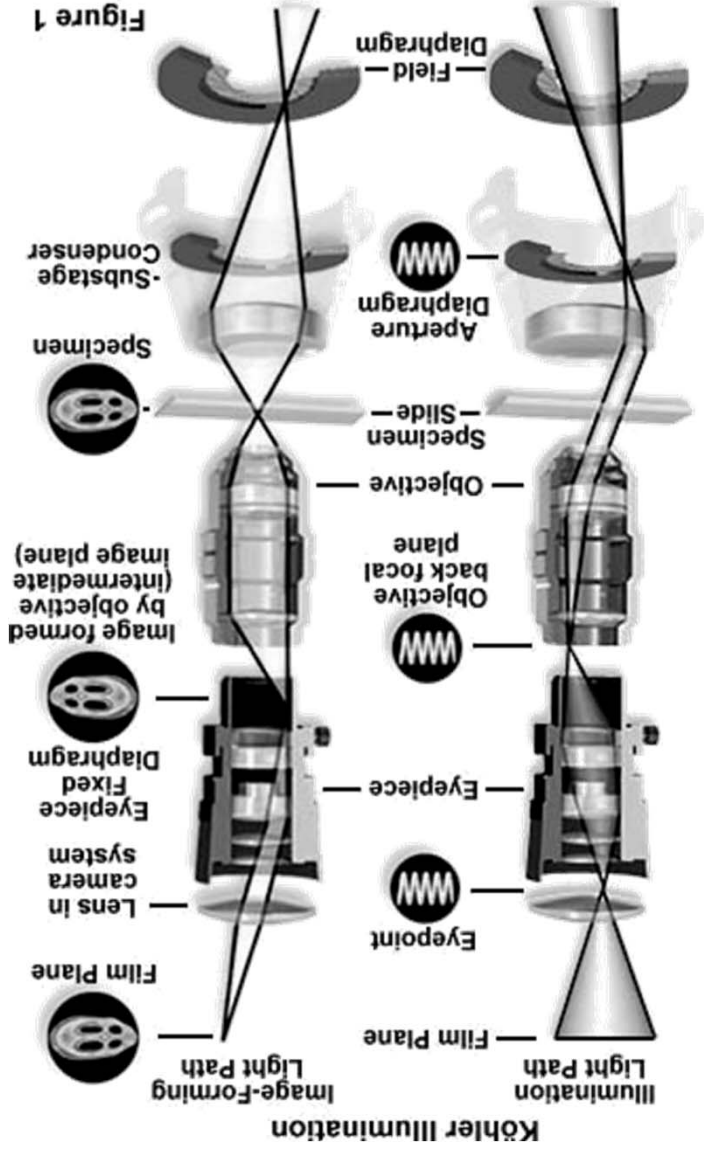
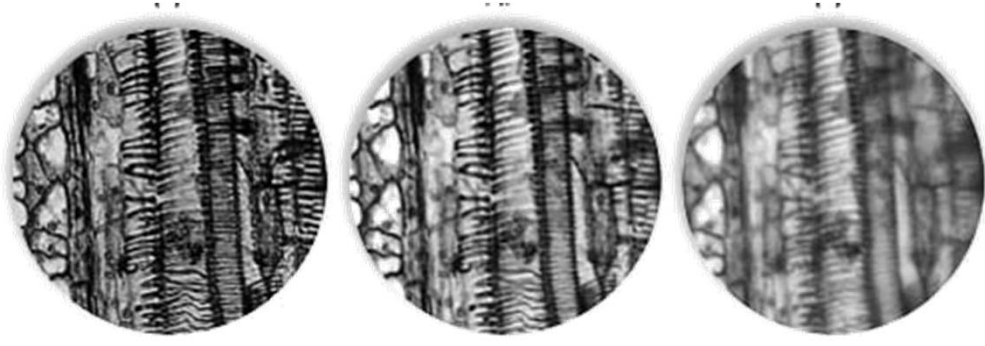
# Microscopio: iluminación Köhler

➤ La iluminación Köhler crea un campo de visión iluminado HOMOGENEAAMENTE mientras la muestra es iluminada por un cono de luz muy ancho.

➤ Se forman dos planos conjugados (separados) de imagen:

1. imagen de la muestra

2. imagen del filamento de la fuente de iluminación.



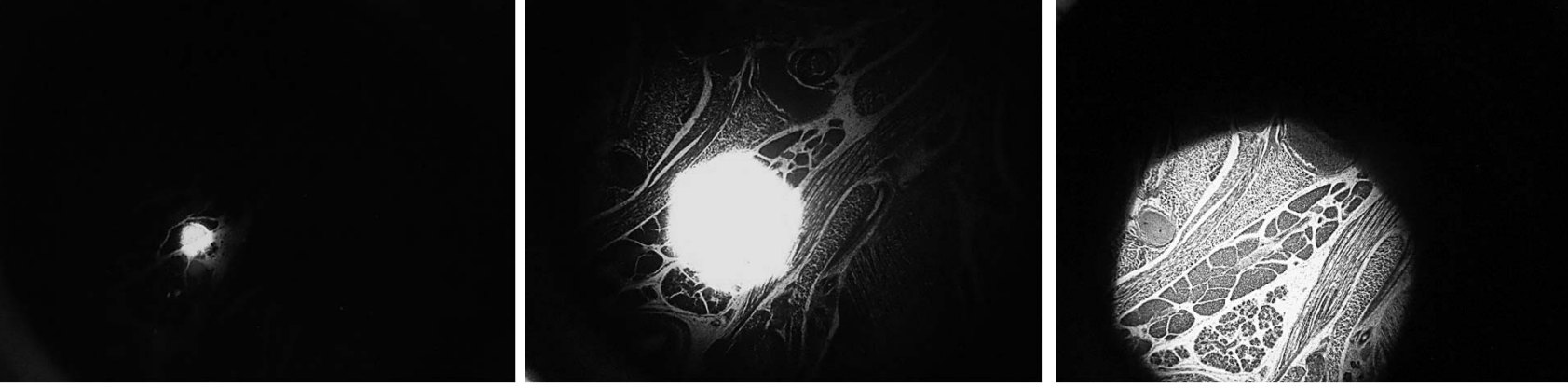
Planos conjugados para los rayos de la fuente de iluminación  
Planos conjugados para los rayos formadores de imagen



**Microscopio: iluminación Köhler**



**Microscopio: iluminación Köhler**

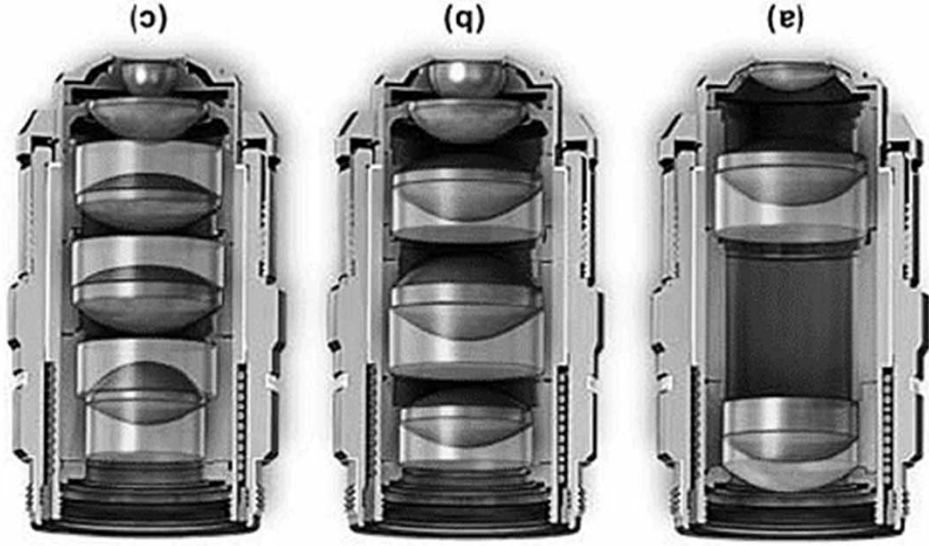


# Microscopio: lente objetivo



Lente Objetivo → coleccionar la luz proveniente del espécimen y proyectar una imagen nítida, real, invertida y aumentada hacia el cuerpo del microscopio.

# Microscopio: lente objetivo

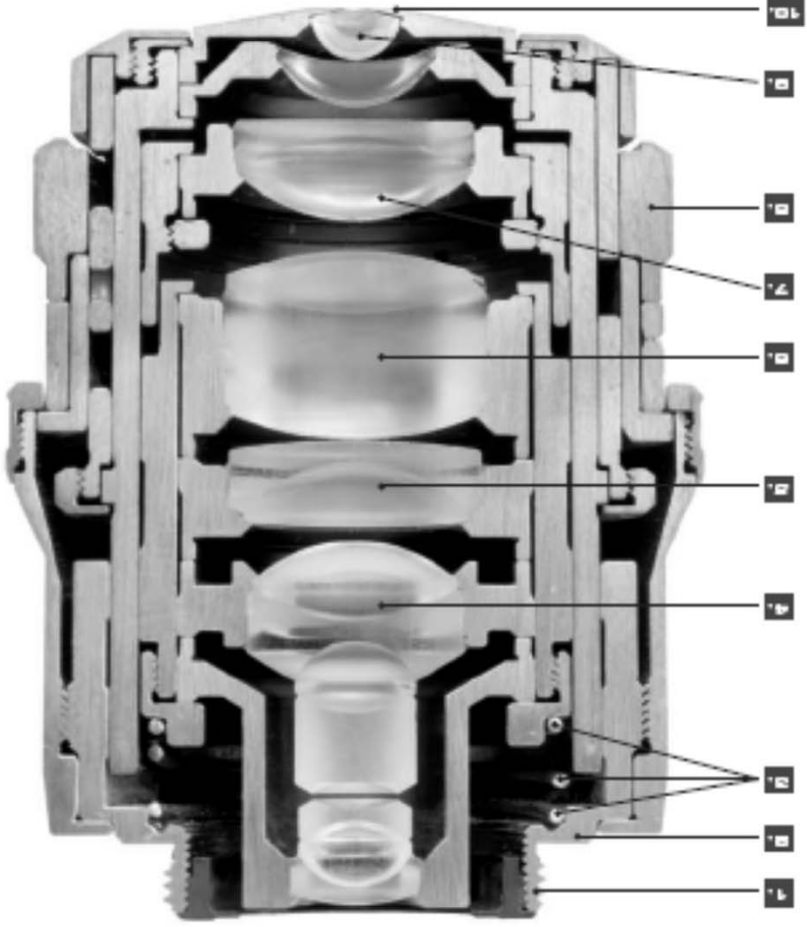


Tipos de objetivos. (a) Objetivo acromático que contiene una lente frontal y dos pares internos, (b) objetivo semi-apocromático o fluorita, con cuatro pares de lentes y (c) objetivo apocromático que contiene un triplete, dos pares, un menisco y una lente esférica frontal

## Estructura de los objetivos

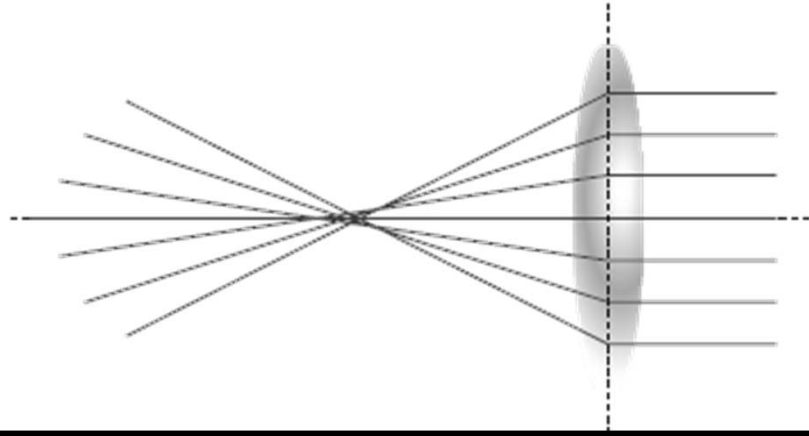
Cross section of an objective

- 1 Objective thread
- 2 Stop face of the objective
- 3 Spring system for the specimen-protection mechanism
- 4-7 Lens groups for the correction of image errors
- 8 Correction collar for adapting to deviating cover glass thicknesses or temperatures
- 9 Front lens system
- 10 Front lens holder

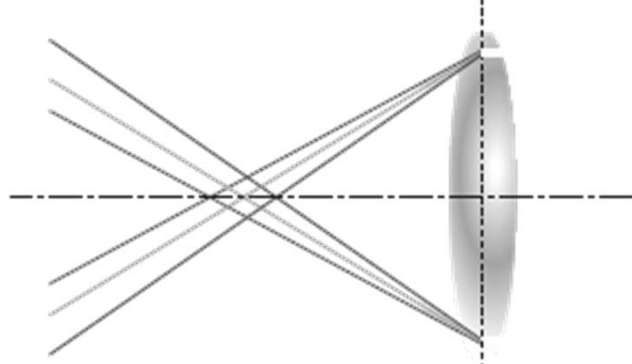


# Microscopio: lente objetivo-aberraciones

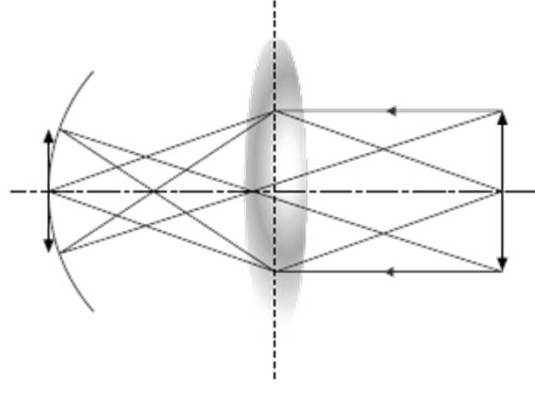
**Aberración de esféricidad.** Los rayos que inciden paralelamente al eje principal no convergen todos en un mismo punto.



**Aberración cromática.** La luz blanca se descompone al atravesar la lente y las diversas longitudes de onda convergen en varios puntos focales diferentes.



**Aberraciones geométricas:**  
Astigmatismo  
Coma  
Distorsión  
Curvatura del campo



# Microscopio: lente objetivo-aberraciones

Objective Type	Spherical Aberration	Chromatic Aberration	Field Curvature
----------------	----------------------	----------------------	-----------------

Achromat	1 Color	2 Colors	No
----------	---------	----------	----

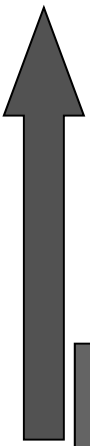
Plan Achromat	1 Color	2 Colors	Yes
---------------	---------	----------	-----

Fluorite	2-3 Colors	2-3 Colors	No
----------	------------	------------	----

Plan Fluorite	3-4 Colors	2-4 Colors	Yes
---------------	------------	------------	-----

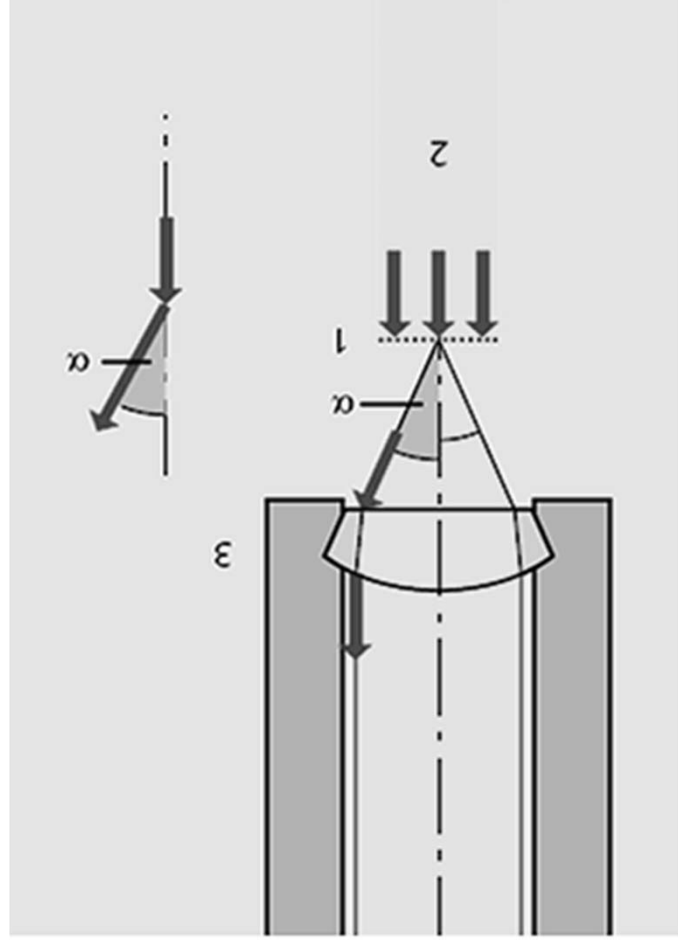
Plan Apochromat	3-4 Colors	4-5 Colors	Yes
-----------------	------------	------------	-----

**PLAN** - corregidos para curvatura del campo (plan-achromáticos, plan-fluoritas o plan-apocromáticos).



# Microscopio: apertura numérica

**Resolución.** Es la capacidad que tiene un sistema óptico de aislar dos puntos que se encuentran muy próximos entre sí, de manera que se puedan ver individualizados uno del otro



$$NA = \eta \sin \alpha$$

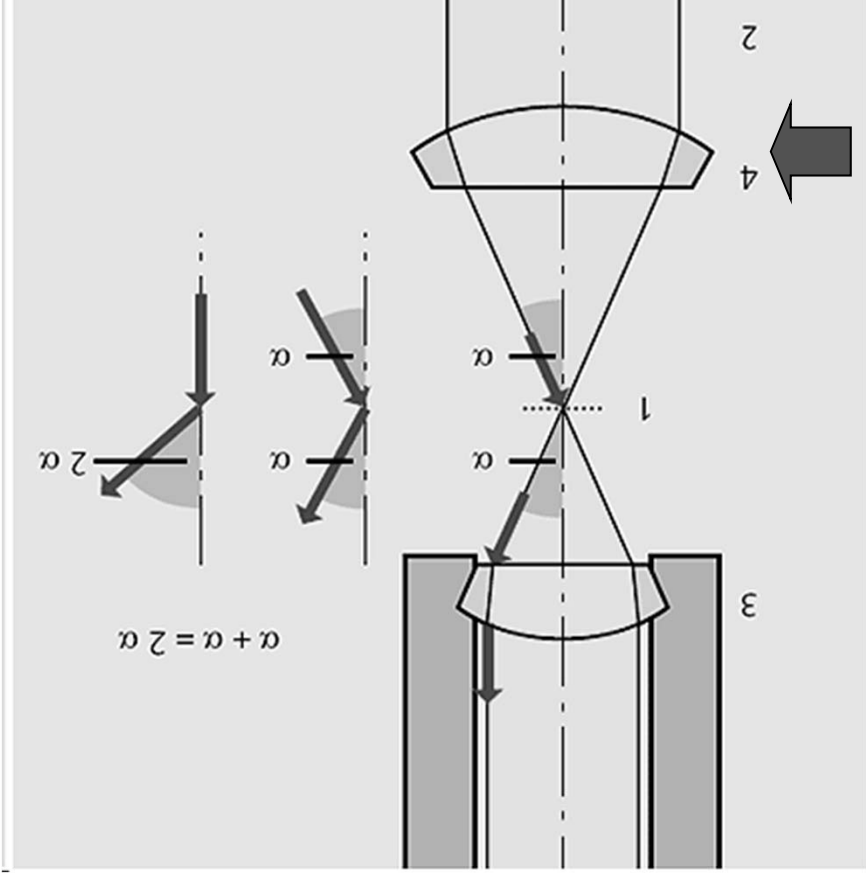
- $NA$  es la apertura numérica
- $\eta$  = el índice de refracción más bajo entre la muestra y el primer elemento del objetivo
- $\alpha$  es  $1/2$  de la apertura angular del objetivo
- $\eta = 1$  para aire
- $\eta = 1.33$  para agua
- $\eta = 1.515$  para aceite o vidrio

**Ernst Abbe**

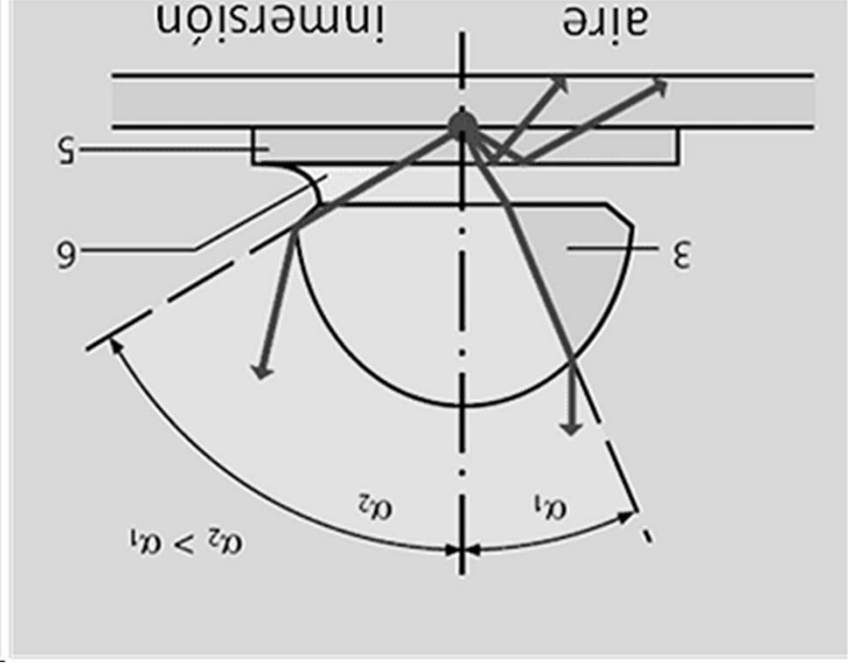
# Microscopio: apertura numérica

## Información

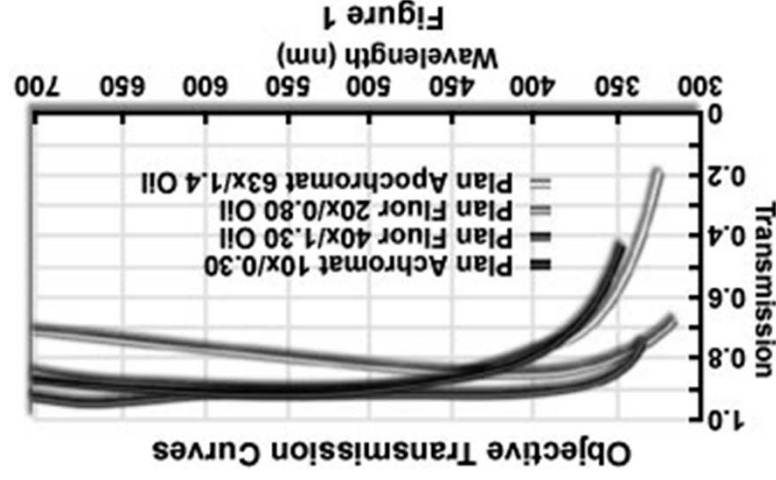
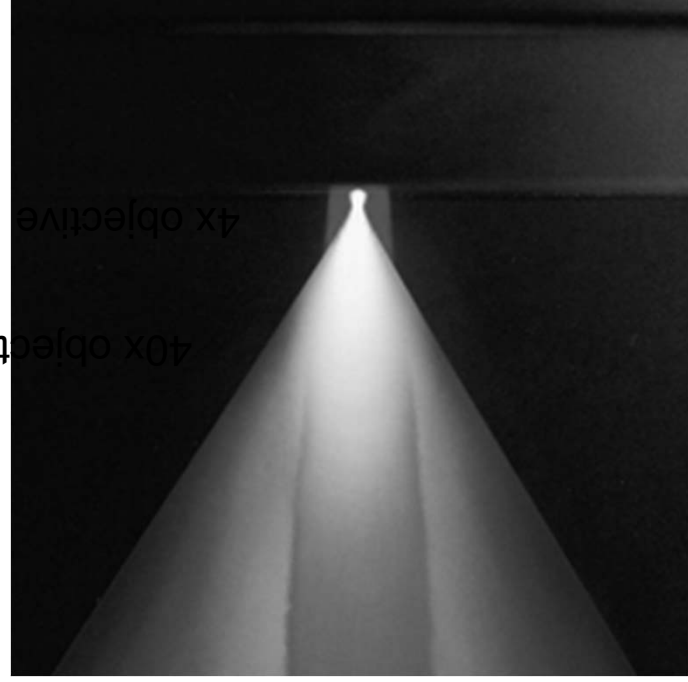
El objeto (1) es iluminado con un rayo de luz (2) que formará un cono luminoso frente al objetivo. Se colocó otra lente (4) que recoge y condensa la luz antes que ilumine al objeto.



A la izquierda el espacio entre el cubreobjeto (5) y el objetivo (3) es ocupado por el aire; a la derecha el espacio es ocupado por un líquido de inmersión (6). Apréciase que el cono de luz y el ángulo a son mayores con inmersión.



# Microscopio: apertura numérica- brillo en la imagen



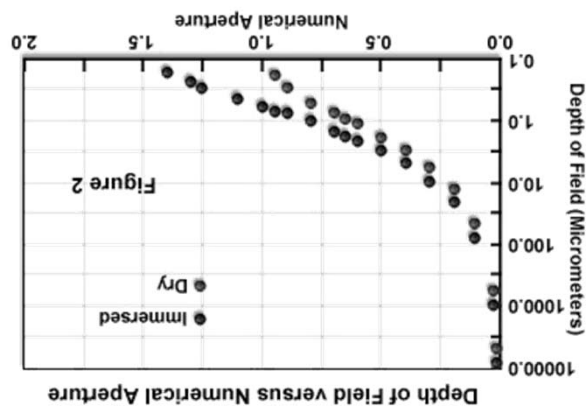
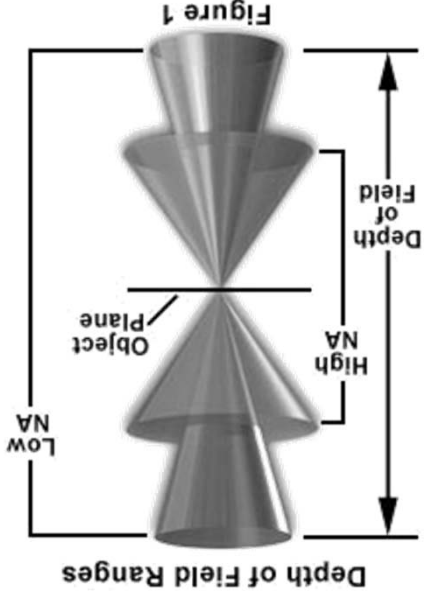
- La intensidad de la luz *colectada* disminuye con el cuadrado de la magnificación.
- La intensidad de la luz *colectada* aumenta con el cuadrado de la apertura numérica.

$$B \propto \frac{(N.A.)^2}{M^2}$$

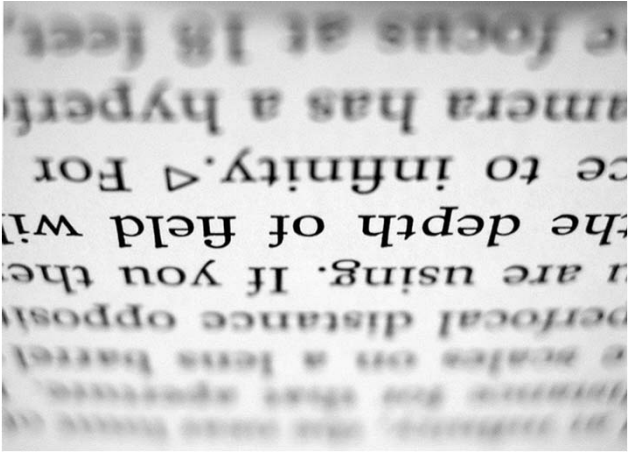
$$NA = n \sin \alpha$$



# Microscopio: Z- profundidad de campo

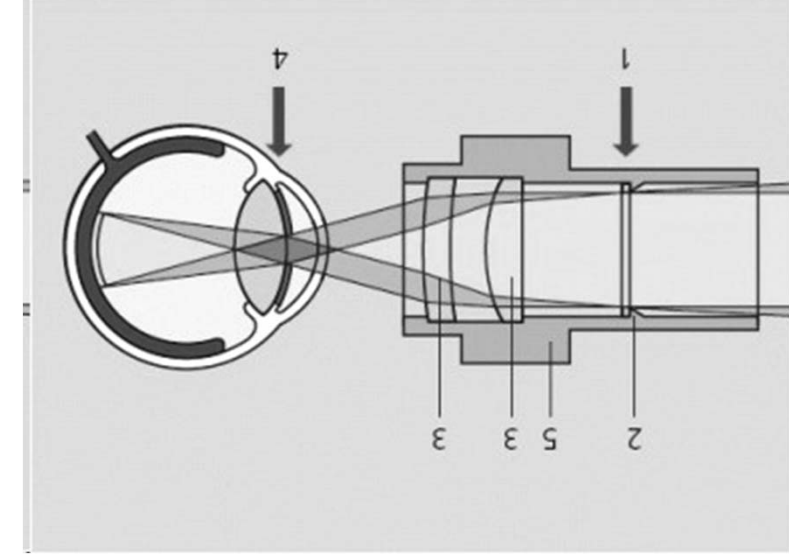
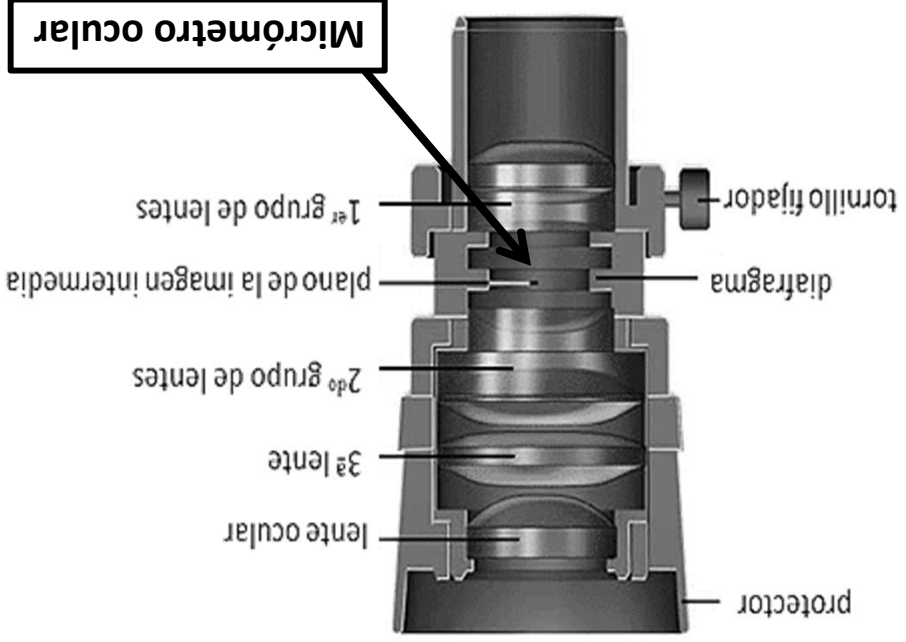


$$Z = n\lambda/NA^2$$



Magnificatio	n	Numerical Aperture	Depth of Field (µm)	Image Depth (mm)
4X	0.10	55.5	0.13	0.13
10X	0.25	8.5	0.80	0.80
20X	0.40	5.8	3.8	3.8
40X	0.65	1.0	12.8	12.8
60X	0.85	0.40	29.8	29.8

# Microscopio: lente ocular

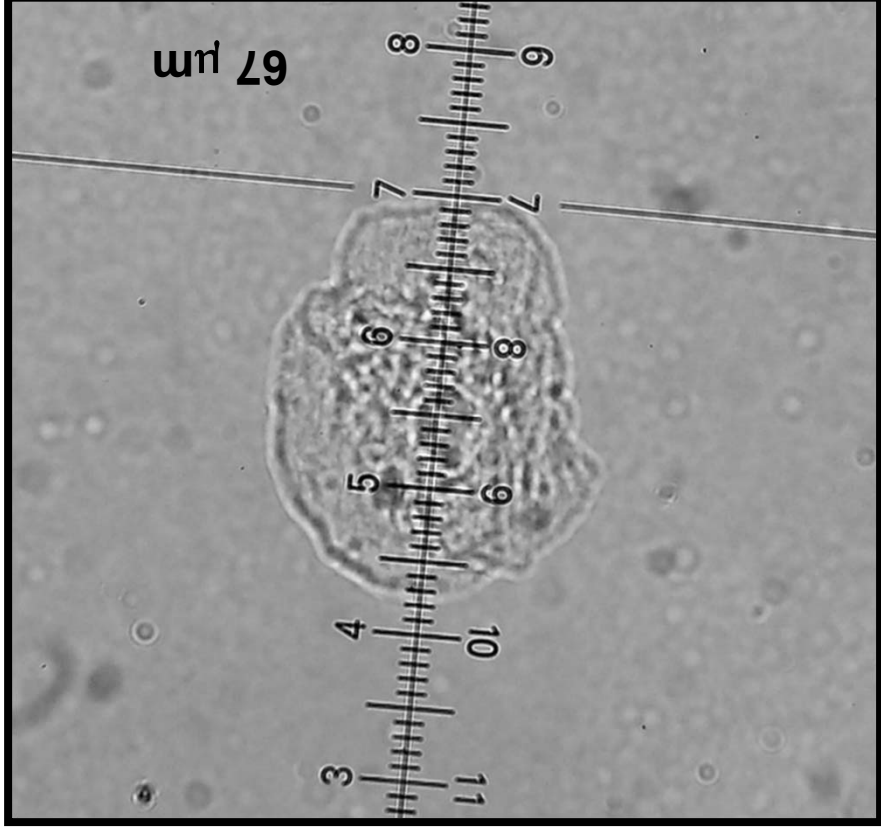
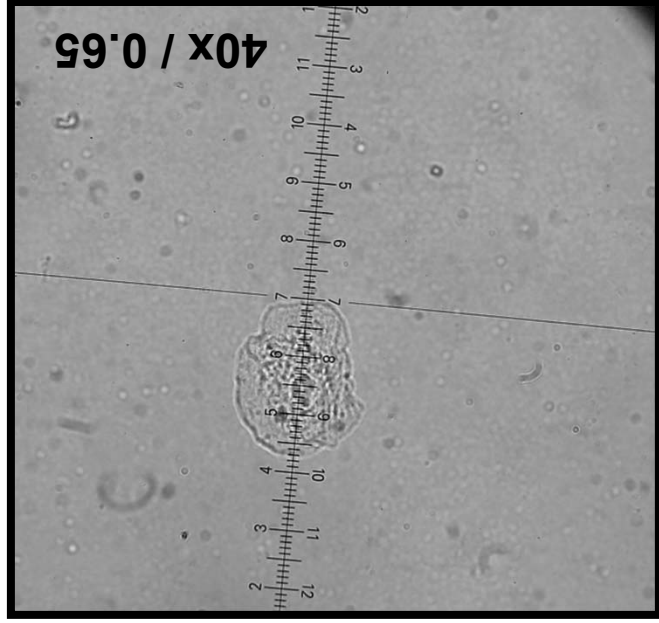
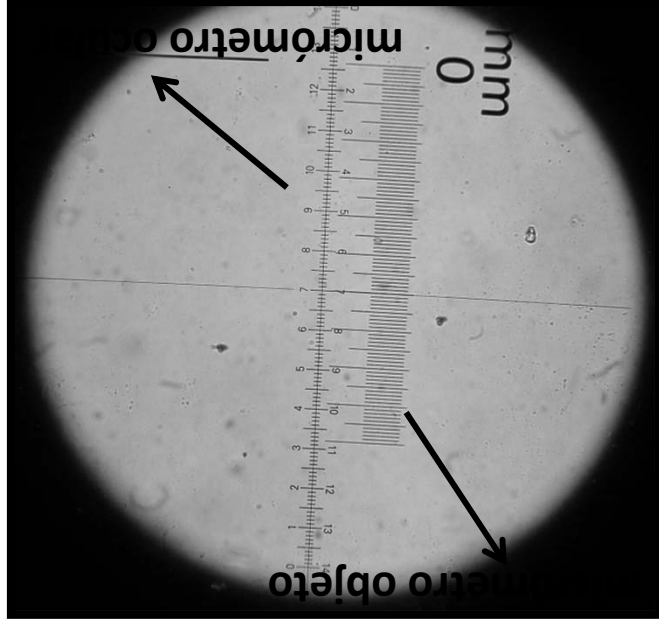


- 1- Imagen intermedia ( y posición del retículo)
- 2- Límite de campo visual
- 3- Óptica del ocular
- 4- Pupila del ocular/ ojo
- 5- Anillo corrector

- **Ocular**
  - Aumenta la imagen y la transforma en una imagen virtual, derecha con respecto a la imagen del objetivo, pero aun invertida, con respecto al objeto.
  - Apiana y aclara el campo óptico o plano circular en el que aparece el objeto.

**Aplicación del micrómetro ocular:** cuantificación o medición de estructuras del espécimen en estudio

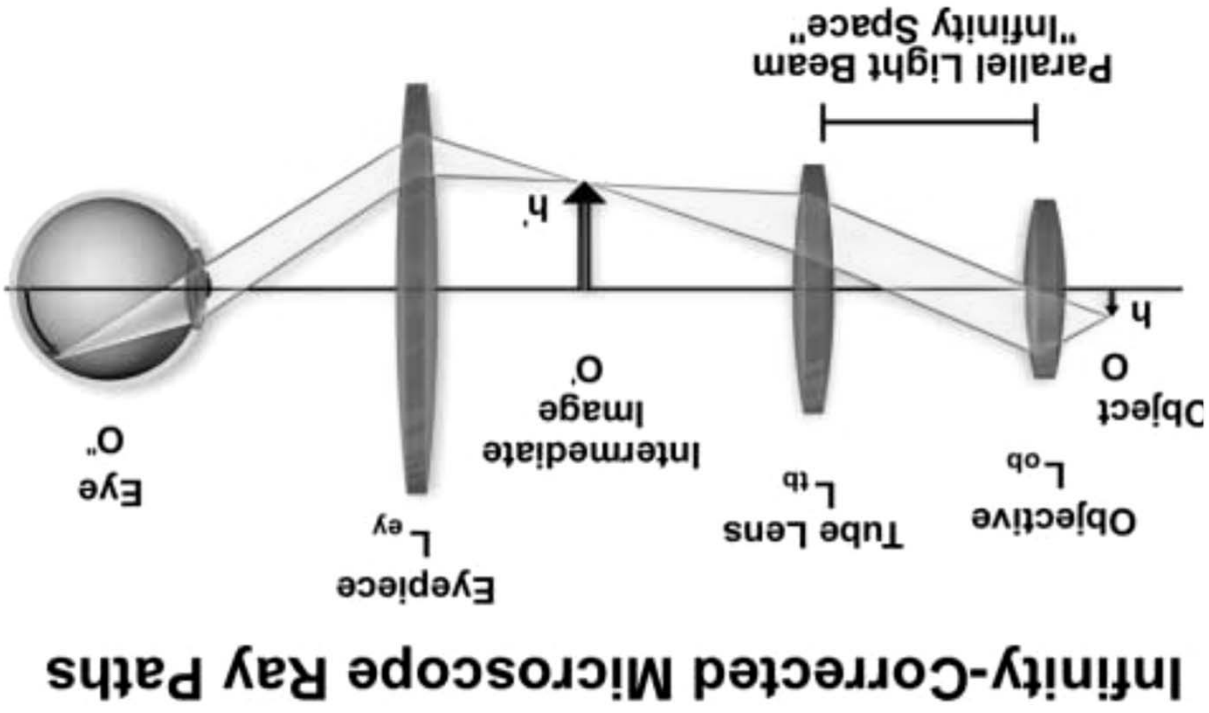
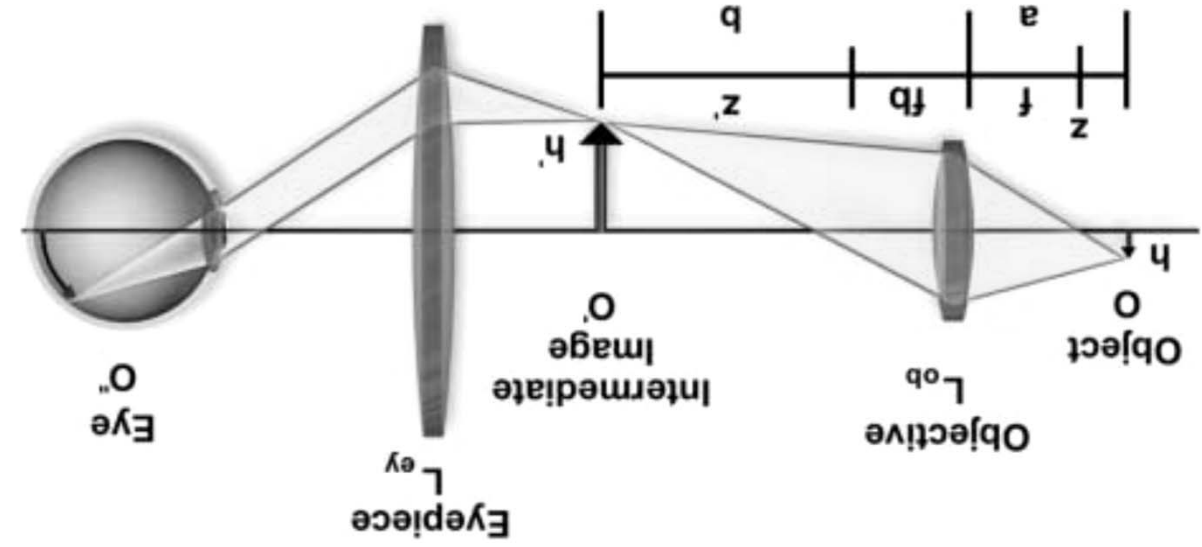
**Micrómetro ocular – micrómetro objeto:** cuantificación o medición de estructuras del espécimen en estudio



**TRABAJO PRÁCTICO: MICROSCOPIA ÓPTICA**

# Microscopio: ICS, óptica corregida al infinito

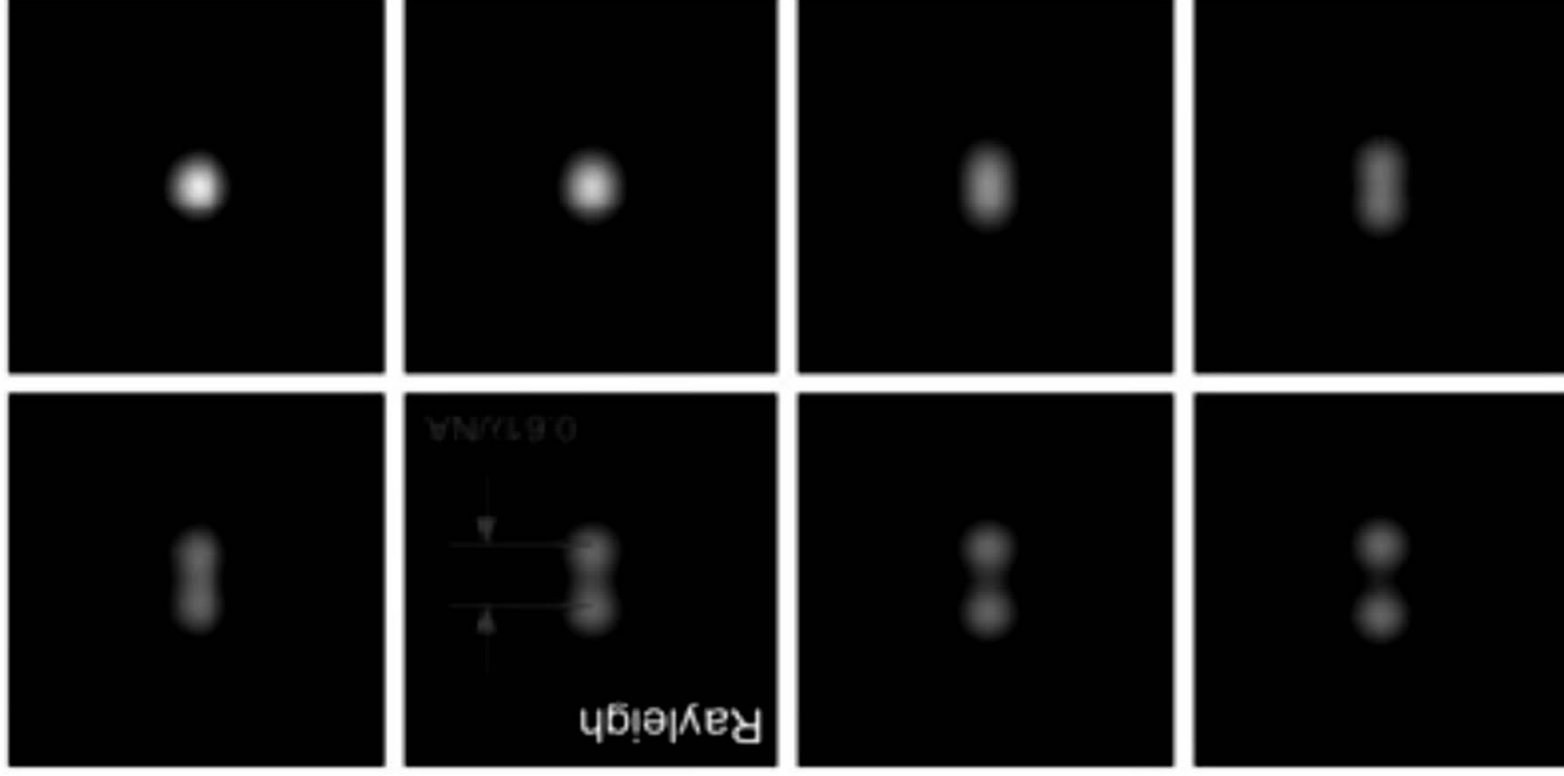
- ✓ *mayores distancias de trabajo*
- ✓ *posibilita accesorios*



# Microscopio: resolución – conceptos básicos

*Cuán cerca deben estar dos fuentes puntuales iguales para que se vean como dos puntos?*

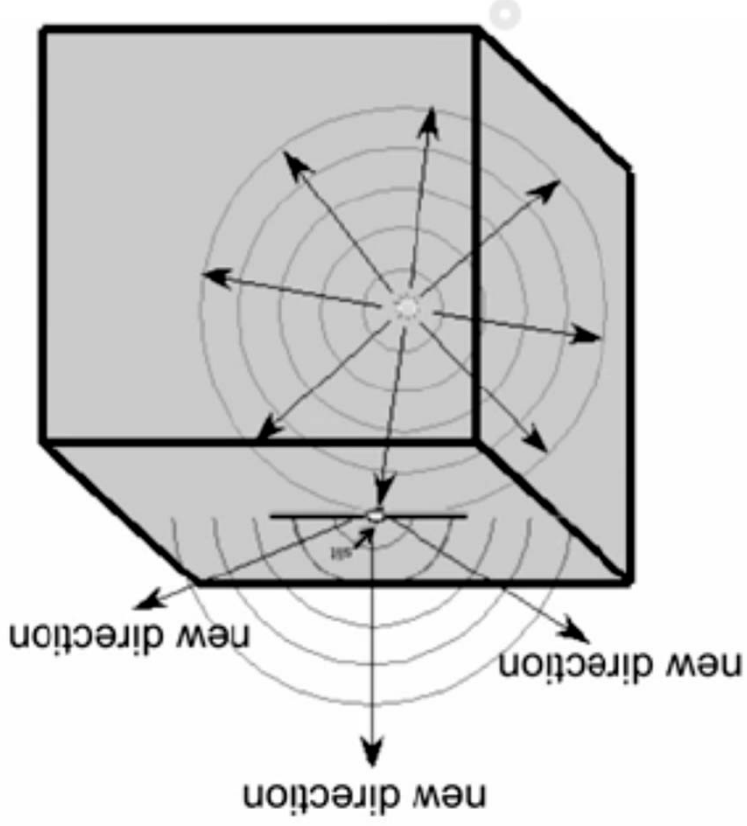
## Difracción y PSF



# Conceptos básicos: luz- interferencia y difracción

La **interferencia** es la combinación por superposición de dos o más ondas que se encuentran en un punto del espacio.

La **difracción** es la desviación que sufren las ondas alrededor de los bordes y esquinas cuando una porción de un frente de ondas se ve cortado o interrumpido por una barrera u obstáculo.

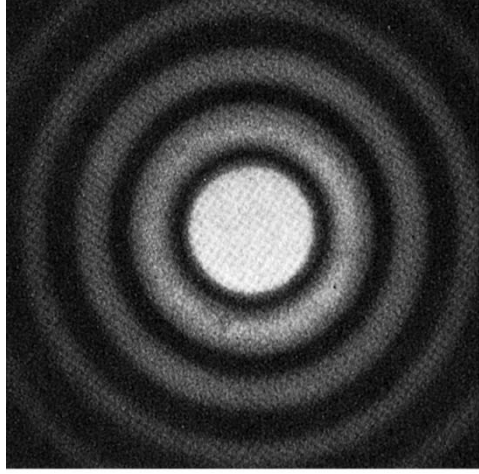


**Resolución en el microscopio**

## PSF, Point Spread Function

La  $PSF$  es la función que define la forma que toma una fuente puntual (es decir, un objeto idealmente adimensional) de luz al pasar a través de un sistema óptico de características particulares al formar una imagen.

$$\text{Imagen} = \text{Objeto} \otimes \text{PSF}$$



Se define como el patrón de difracción tridimensional de la luz emitida por un punto infinitesimalmente pequeño en el espécimen y transmitido al plano imagen a través de una lente objetivo de apertura numérica NA.

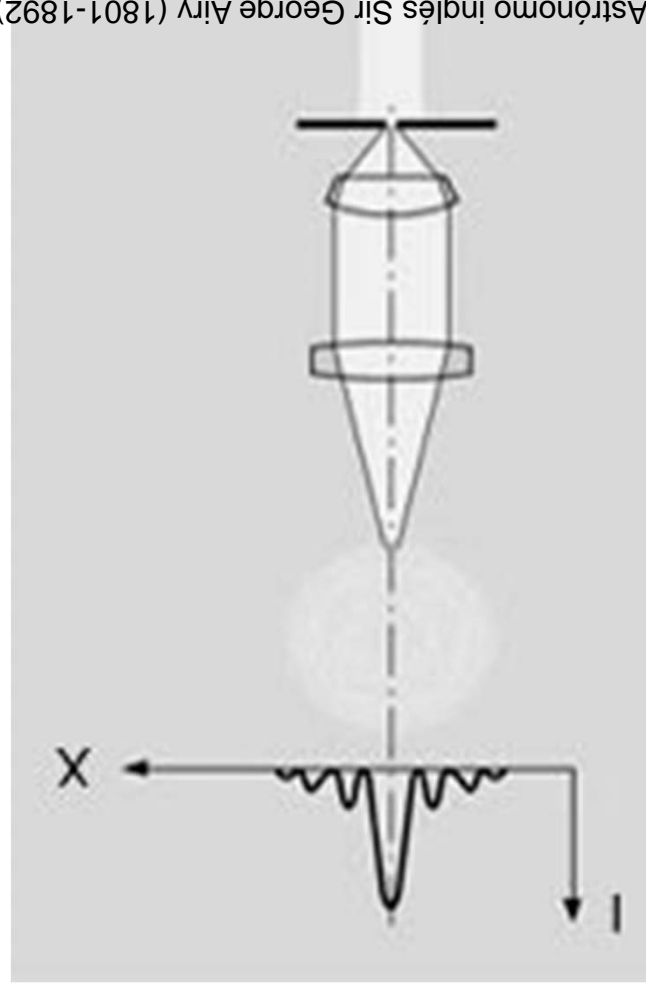
*patrón de difracción de Airy*

# Microscopio: óptica limitada por difracción

Límite de resolución es la **distancia mínima** apreciable  $d$  entre dos puntos, según el criterio de Rayleigh, es:

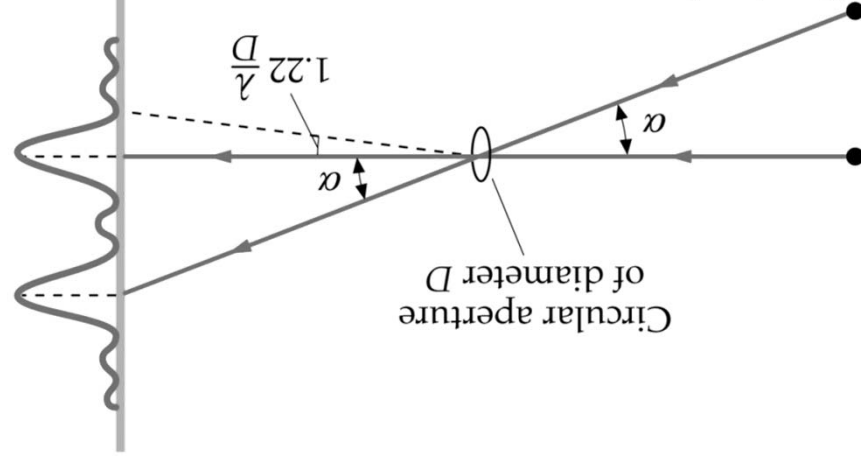
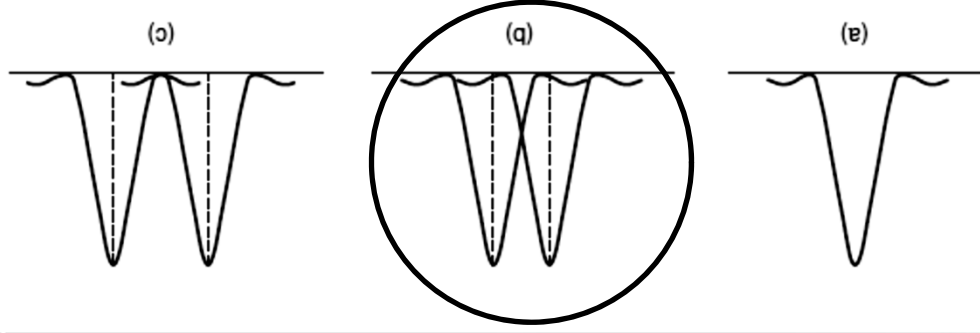
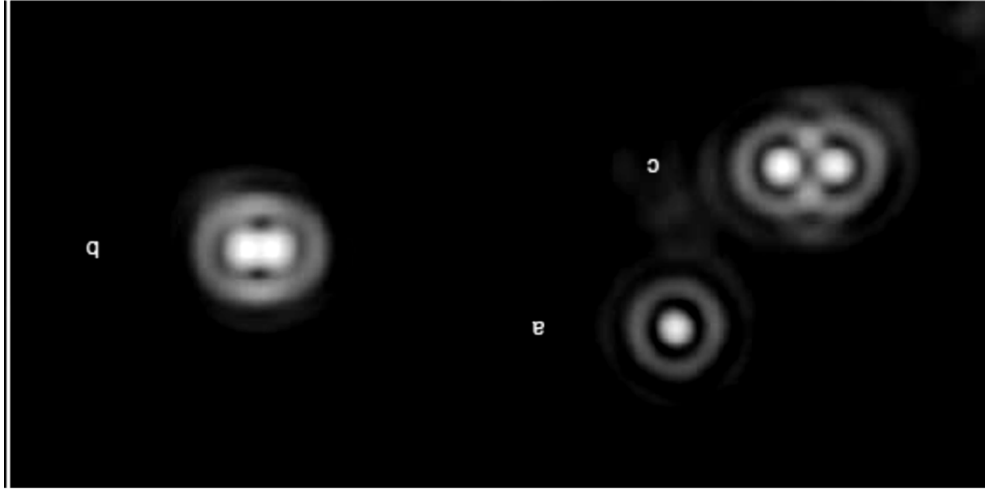
$$d_0 = 1.22 \lambda_0 / NA_{obj} + NA_{cond}$$

Astrónomo inglés Sir George Airy (1801-1892)





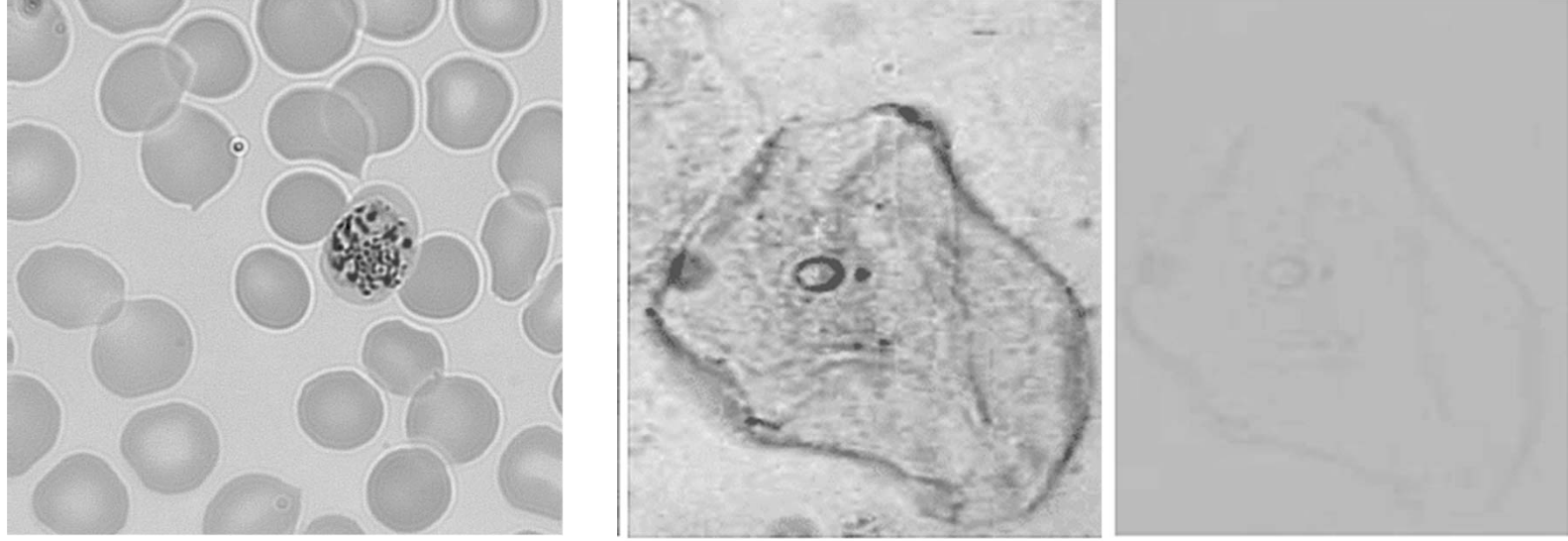
# Microscopio: óptica limitada por difracción



Un criterio de uso muy extendido de la resolución de dos objetos puntuales, conocido como **criterio de Rayleigh**, es que los objetos están apenas resueltos si el centro de un patrón de difracción (máximo) coincide con el primer mínimo del otro.

$$d = 1.22 \lambda / NA$$

## Técnicas especiales: contraste

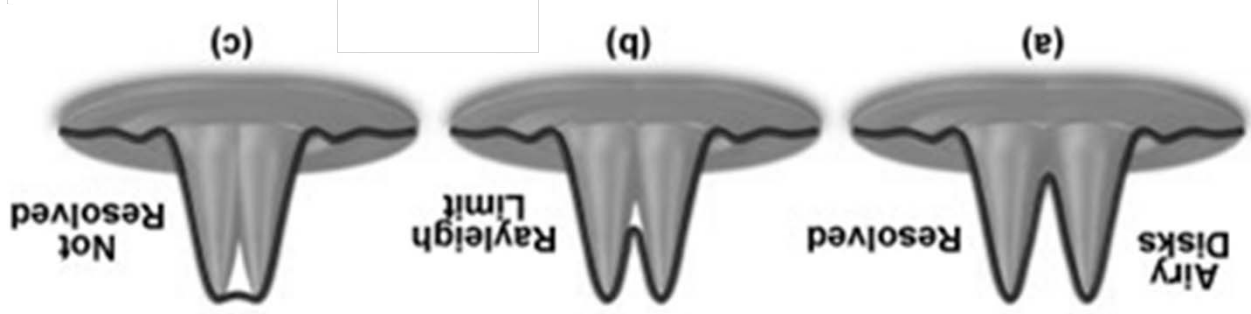


Micrografía en campo claro de una célula epitelial de la mucosa bucal antes (izquierda) y después (derecha) de modificación digital para mejorar el contraste.

# Técnicas especiales: contraste

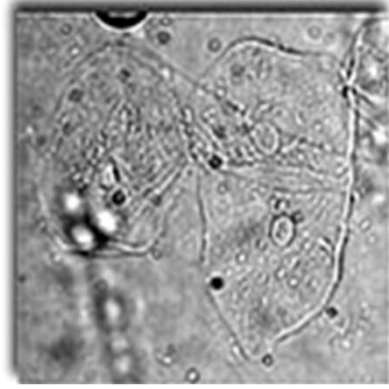
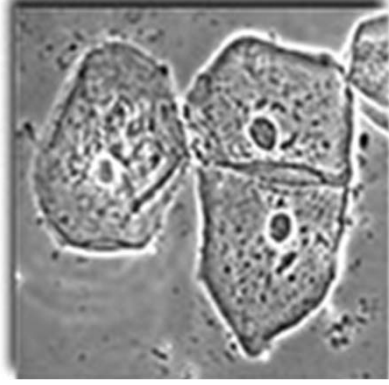
Se han diseñado técnicas microscópicas más complejas que incrementan el contraste sin afectar la resolución. Los principios básicos de estas técnicas especiales de microscopía se basan en:

➤ La modificación de la manera como incide la luz sobre el espécimen: *empleo de condensadores y filtros.*



➤ La modificación de la fuente emisora de luz: *cambiando la luz blanca por luz ultravioleta o láser.*

## FLUORESCENCIA

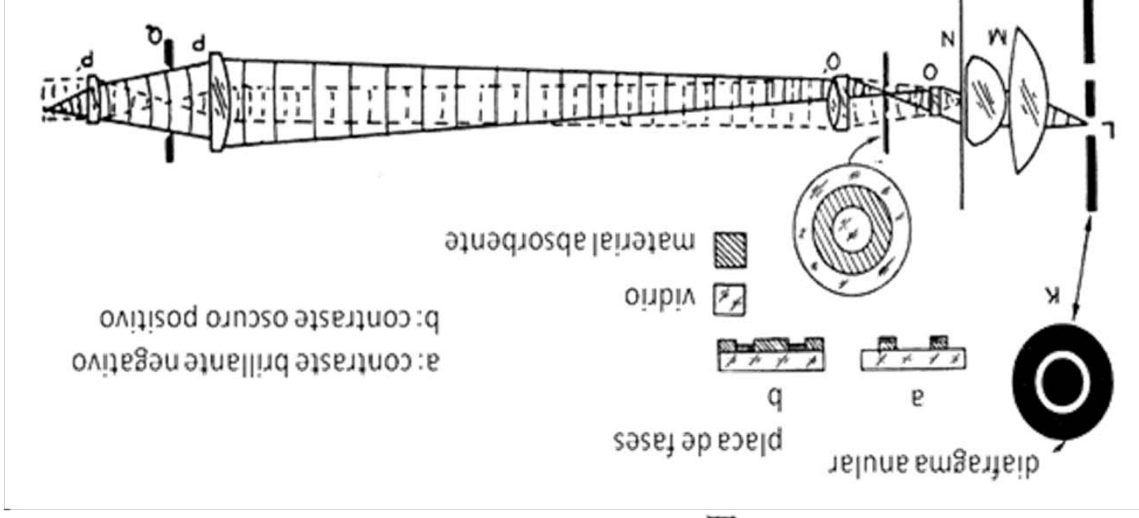
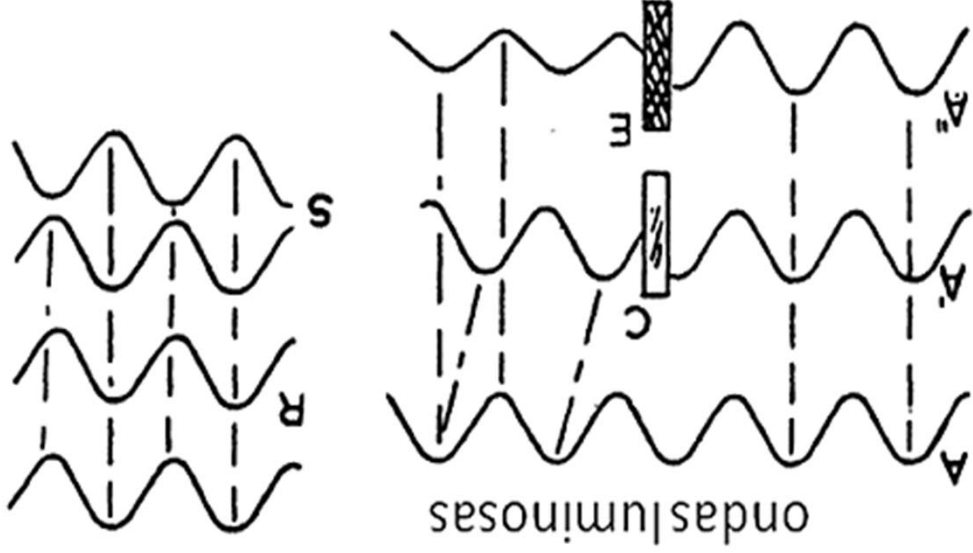


# Técnicas especiales: microscopía de contraste de fase

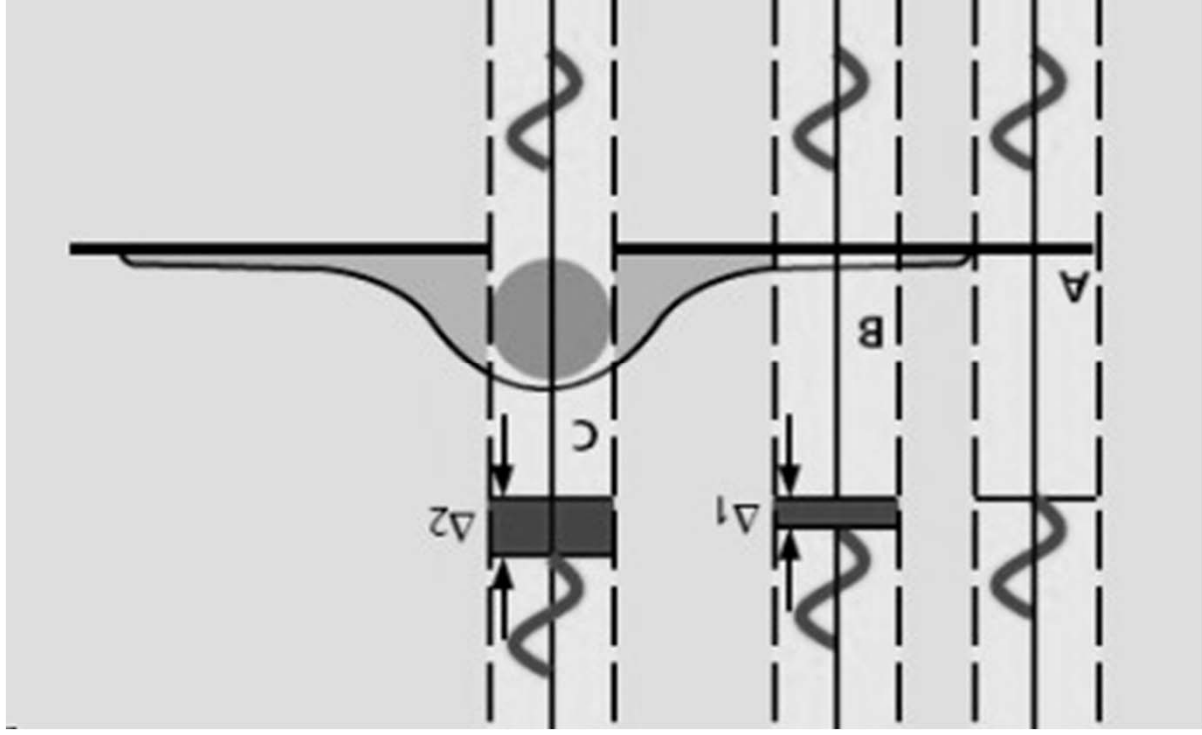
Microscopio de contraste de fase

■ el ojo humano *no es sensible* a estas *diferencias de fase*

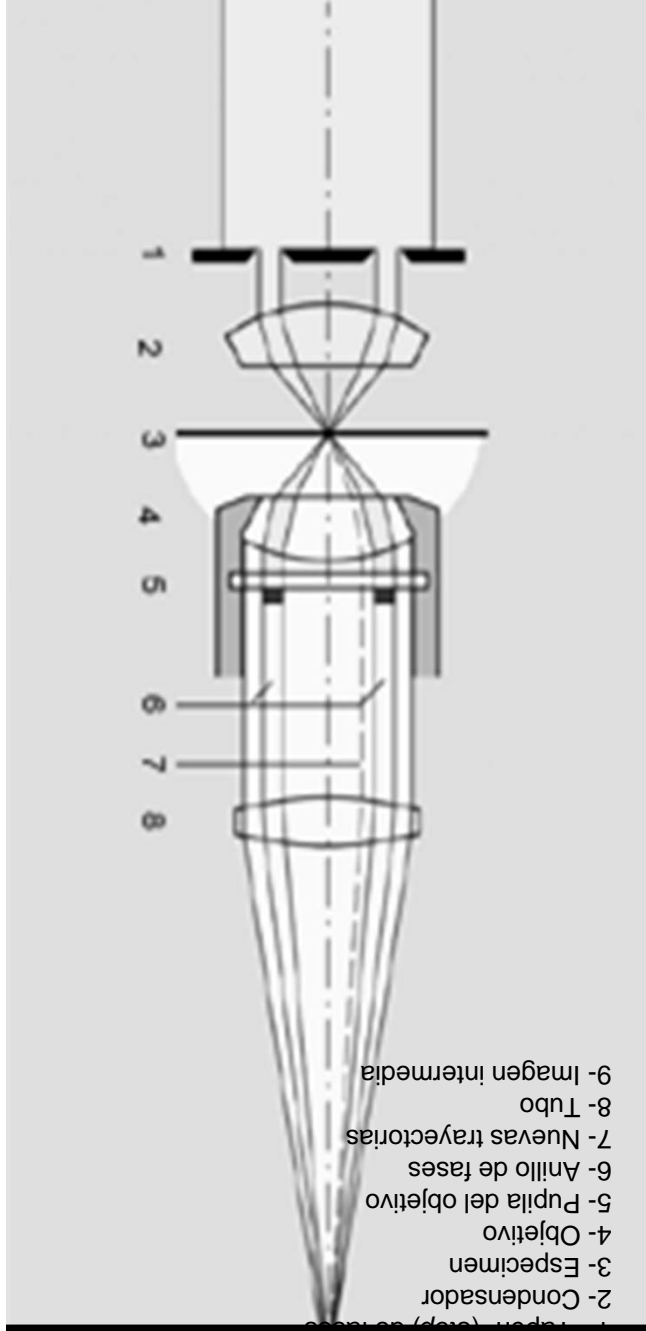
■ las *diferencias de amplitud* sí *son visibles*.



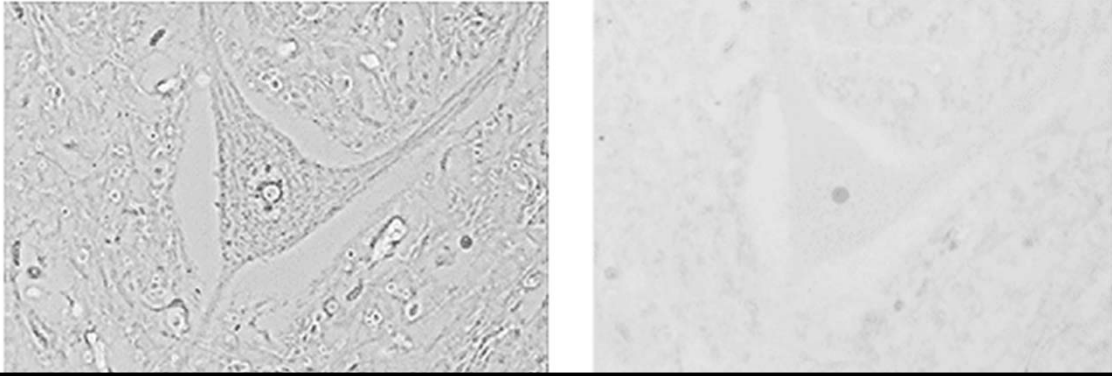
# Técnicas especiales: microscopía de contraste de fase



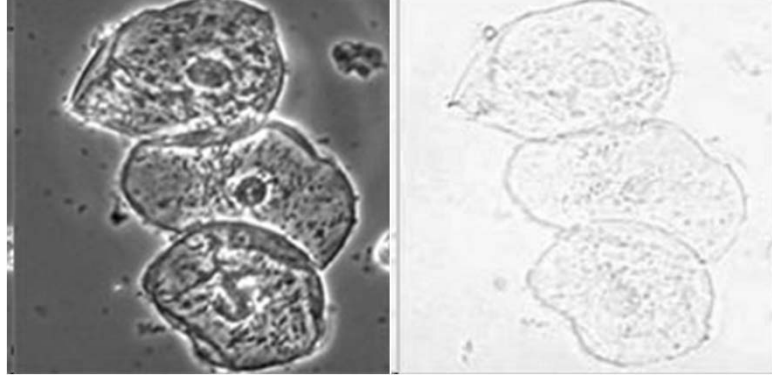
Este método induce variaciones sutiles en el índice de refracción (determinado por el espesor) de los especímenes translúcidos permitiendo visualizar detalles en la estructura, los cuales pasarían desapercibidos con una iluminación de campo claro



# Técnicas especiales: microscopía de contraste de fase



Micrografías de una neurona en campo claro (izquierda) con detalles casi invisibles y con iluminación de **contraste de fases oscuro o positivo** (derecha) en el que los detalles son más evidentes en un fondo claro.



Micrografía de células epiteliales en cultivo mediante la técnica de **contraste de fases brillante o negativo**, en la cual los detalles y bordes de las células aparecen brillantes (debido a un halo de difracción) en un fondo oscuro.

## *Aplicaciones del microscopio de contraste de fases*

- Observación de células y tejidos vivos.
- Estudio de alimentos y medicinas.
- Análisis de materiales industriales
- Estudios geológicos (minerales).

## Tutorials

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/index.html>

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>

<http://www.zeiss.com, ir a Fluorescence Dye and Filter Database>

<http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/accessories>

## Köhler Illumination

<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/kohler.html>

## Fluorescence Microscopy

<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>

Davison, M., Abramowitz, M. *Optical Microscopy*. Olympus Microscopy Resource

Center. <http://www.olympusmicro.com>

Douglas B. Murphy, *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Editorial  
Wiley-Liss, Inc., 2001.