

Laboratorio de Física II (ByG)  
1er. Cuatrimestre 2015

**Guía 2:** Algunos conceptos de Microscopía

Objetivos:

Tener un primer contacto con elementos sencillos de óptica, su manipulación y su montaje.  
Construir y caracterizar un microscopio compuesto.

Introducción, ¿Por qué es importante esta actividad de Microscopía? :

La microscopía se ha convertido sin dudas en una de las herramientas más utilizadas en diferentes áreas de la Ciencias Naturales. Permite el estudio de especies incluso vivas, en su entorno nativo y de manera no invasiva.

Hoy en día existen comercialmente distintos tipos de microscopios. Entre los más populares están el microscopio óptico convencional, el microscopio de fluorescencia, el microscopio confocal y el microscopio por absorción de 2 fotones.

El microscopio comercial más simple consta de 2 lentes, una *lente objetivo* (la más cercana al objeto a observar) y una *lente ocular*. La lente objetivo forma una imagen ampliada del objeto que vuelve a ser aumentada por la lente ocular. De esta manera se alcanzan aumentos muy superiores a los que se pueden obtener con una lupa.

En el microscopio de fluorescencia, la muestra (previamente marcada con una sonda fluorescente) es iluminada con luz cuya longitud de onda (color) corresponda a una absorción del marcador fluorescente. En esa condición la muestra fluoresce y es la fluorescencia la que se usa para formar la imagen. Como la emisión fluorescente está corrida hacia longitudes de onda mayores con respecto a la excitación, estos microscopios usan un espejo dicróico que refleja la excitación y transmite la emisión. De esta manera es posible separar la emisión de la excitación de la muestra.

El microscopio confocal forma una imagen “nítida” que observada con un microscopio convencional parecería “borroneada”. Esto se logra excluyendo la mayor parte de la luz que proviene de zonas de la muestra que no están en foco. De este modo, la imagen obtenida tiene mayor contraste que la obtenida con un microscopio convencional y representa un corte de la muestra de aproximadamente 1 micrón de altura y 1 micrón de lado.

Por último, en un microscopio por absorción de 2 fotones, la excitación de la molécula desde su estado fundamental al primer excitado se da por la absorción “simultánea” ( $10^{-16}$  seg) de 2 fotones de la mitad de la energía (es decir del doble de la longitud de onda). El primer fotón excita a la molécula a una estado intermediario y el segundo fotón lo lleva al estado excitado. Los 2 fotones tienen la mitad de la energía (el doble de la longitud de onda) necesarios para producir la excitación por absorción de 1 fotón. Por ejemplo, dos fotones en la región roja del espectro (aprox 700nm) pueden combinarse para excitar a una sonda sensible a calcio como el Fura2 cuya absorción está en la región UV del espectro (aprox 350nm). La probabilidad de absorción “simultanea” de 2 fotones es muy baja. Para que tengan una idea de lo raro de este proceso, una molécula de Rodamina B iluminada con luz solar se excita a través de un proceso de absorción de 1 fotón 1 vez por segundo y

---

lo hace a través de un proceso de absorción de 2 fotones 1 vez cada 10 millones de años!!!. Es justamente esta característica la que aumenta la resolución espacial de estos microscopios con respecto a los microscopios convencionales. En estos casos, las resoluciones alcanzadas son similares a las de un microscopio confocal.

Después de esta brevísima descripción de algunos muy sofisticados microscopios veamos si podemos construir alguno. Intentemos con uno muy sencillo que es la base de todos los que describimos anteriormente, pero para eso empezamos por el principio...una lente!

### Actividades:

No te asustes, esta actividad está pensada para realizarse en más de una clase. En la primera clase se espera que caractericen las lentes y si es posible que construyan por primera vez un microscopio compuesto sencillo. Como trabajo de una clase a la siguiente se espera que discutan en grupo los criterios para determinar el aumento del microscopio. En la segunda clase se espera que armen el microscopio (incluyendo las mejoras que crean necesarias), que adquieran una imagen para calibrar el aumento del microscopio (pasar pixeles de la imagen a micrones en la muestra) y que lo usen para estudiar algunas muestras.

### 1ra. Parte: Estudio de 1 lente:

1- Observá a través de la lente un objeto y describí cualitativamente todo lo que puedas decir de la imagen. Observá especialmente el tamaño y la orientación de la imagen en distintas condiciones. Para esta parte podés utilizar como objeto la máscara que resulta de recortar una silueta iluminada desde atrás.

2- Para distintas posiciones del objeto, determiná la posición y el tamaño de la imagen. ¿Podés decir que la imagen está aumentada? ¿Cómo determinarías el aumento?

3- La expresión de Gauss (ec. 1) relaciona la distancia focal de la lente con las distancias objeto-lente ( $S$ ) e imagen-lente ( $S'$ ). ¿Con qué error estimás estarías determinando la distancia focal de la lente usando este método?

$$\frac{1}{S} + \frac{1}{S'} = \frac{1}{f} \quad \text{ec. 1}$$

Un método sencillo como es el trazado de rayos, método que proviene de la óptica geométrica, permite estimar el tamaño y la posición de la imagen para un sistema de lentes. Figura 1.

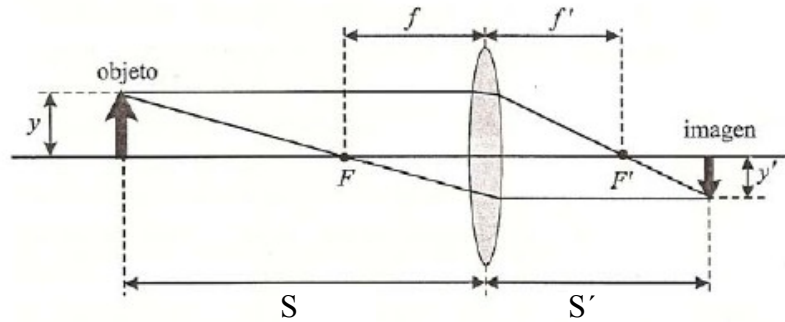


Figura 1: Esquema del dispositivo con una lente. Definición de las distancias relevantes y método de trazado de rayos.

## 2da. Parte: Construcción de un microscopio compuesto:

Para esta etapa te sugerimos que armes el dispositivo esquematizado en la Figura 2. La *lente objetivo* y la *lente ocular* deberán estar bien sujetas por medio de *vástagos* y *torretas* al *banco óptico* o a la *mesa óptica*. Te sugerimos que te tomes un rato para *alinearse* y fijar todos los componentes cuidadosamente.

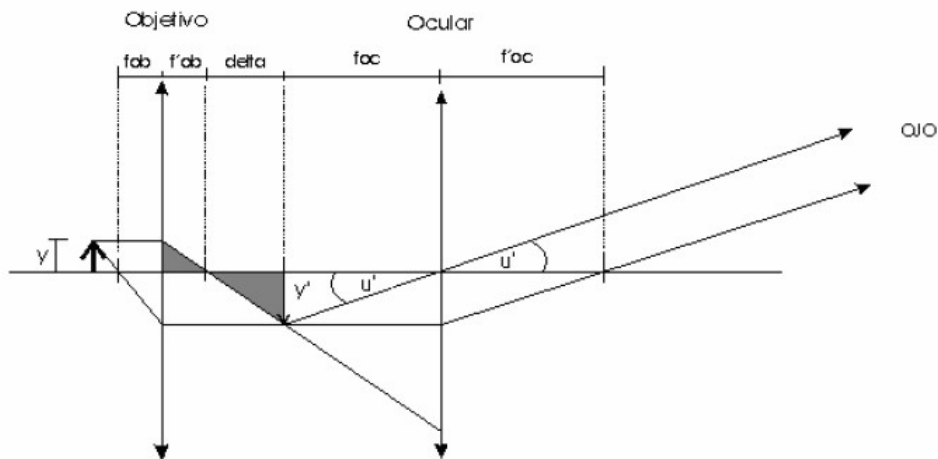


Figura 2: Esquema de un microscopio compuesto. Definición de las distancias relevantes.

- 1- ¿De qué variables depende el aumento para el microscopio construido? ¿Cómo lo determinarías experimentalmente?
- 2- Ahora queremos usar la cámara en lugar del ojo para adquirir imágenes. ¿Cómo cambiás el dispositivo?