

# Óptica

2015

## A (very) brief history of microscopy

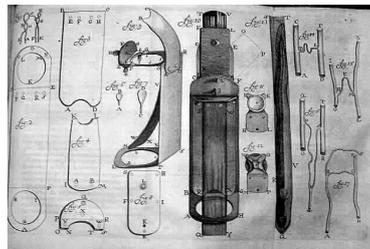
XVII Century



*[They] were incredibly small, nay so small, in my sight, that I judged that even if 100 of these very wee animals lay stretched out one against another, they could not reach to the length of a grain of coarse Sand'.*

Antonie van Leeuwenhoek

Looking at bacteria. April 1676

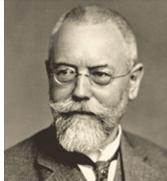


## A (very) brief history of microscopy

From XVIII Century to mid XIX Century

## A (very) brief history of microscopy

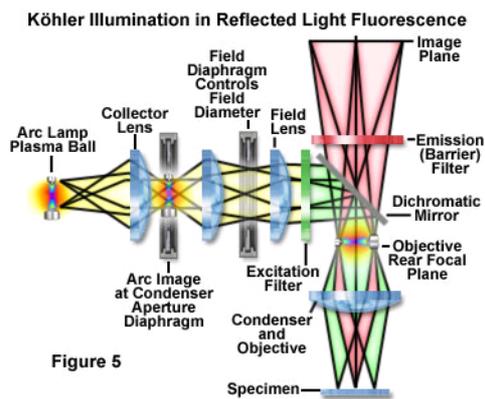
Late XIX Century onwards



**August Köhler**  
1866 – 1948  
Physicist



**Carl Zeiss**  
1816 – 1888  
Optician

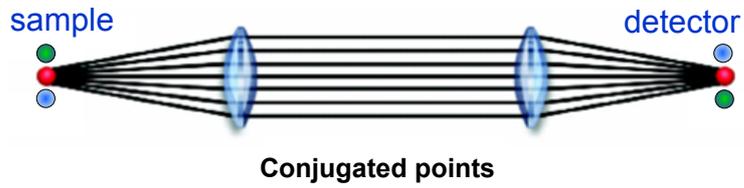
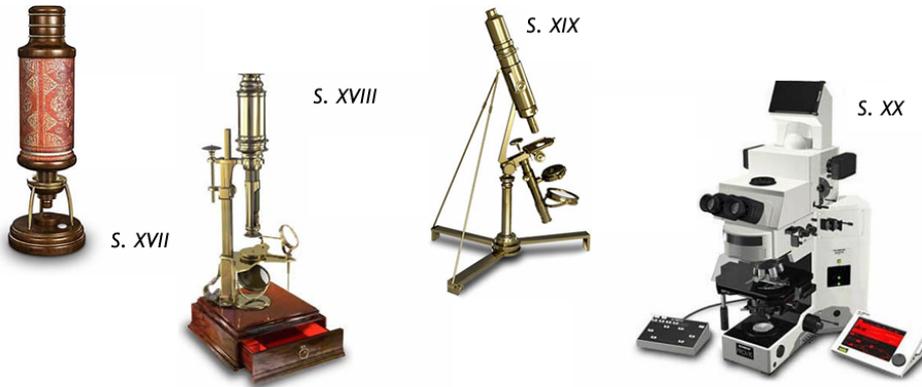


**Otto Schott**  
1851 – 1935  
Chemist

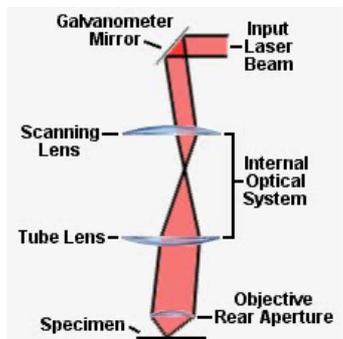
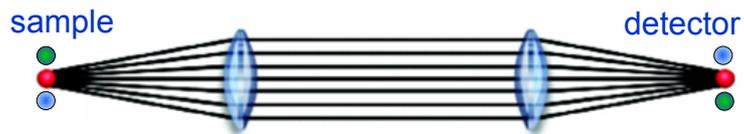


**Ernst Karl Abbe**  
1840 – 1905  
Physicist

# Microscope



# Scanning vs. non-scanning



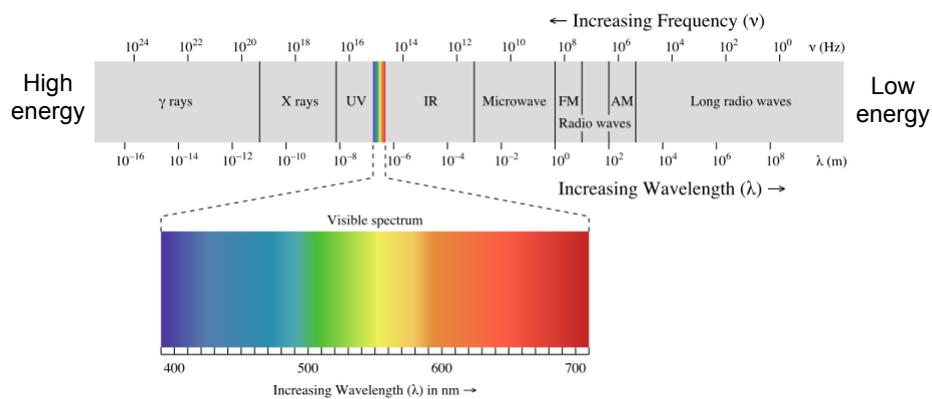
## Data acquisition

**You must understand how different experimental setups works to be able to:**

- Choose the equipment according to your needs
- Optimize the acquisition of the data.
- Be critical about it.
- Analyze it properly.
- Know what you can (and can't do) with each technique.
- Propose new techniques that overcome current limitations.

## Light

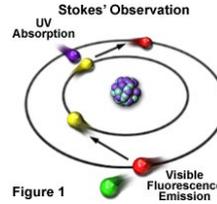
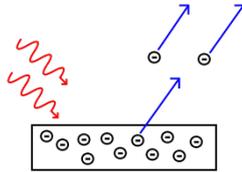
### Electromagnetic Spectrum



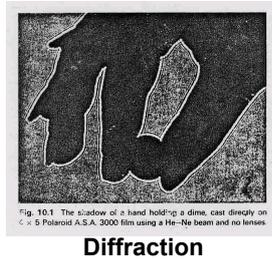
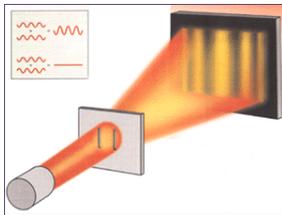
# Dual nature of light

## Particle Nature

i.e. Interaction with detector and sample

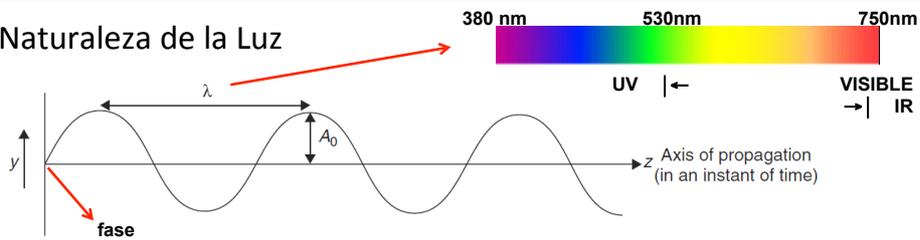


## Wave Nature

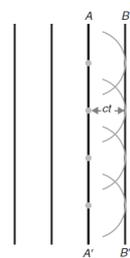


i.e. Resolution limits in microscopy

## Naturaleza de la Luz



Muchos de los fenómenos que ocurren con la luz (refracción, interferencia) se interpretan considerándola como **ondas**: radiación electromagnética que se propaga linealmente (en medios homogéneos), compuesta por un campo eléctrico y uno magnético, en fase y perpendiculares entre sí. Para la detección (e.g. en una CCD, APD, PM) la consideramos como **partículas** (cuantos).



Propagación de un frente de ondas plano

En **óptica geométrica**, representamos la luz como rayos (tren de ondas) propagándose por un medio o un elemento óptico (lente). Los rayos son perpendiculares al frente de onda.

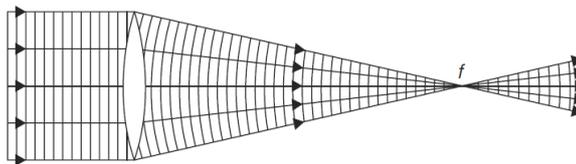
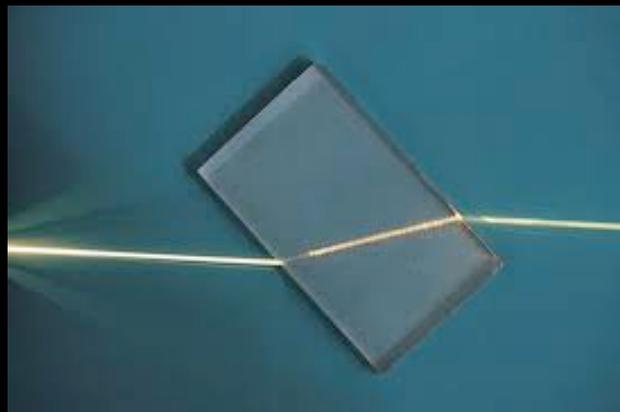


FIGURE 3-7 Because light travels more slowly through glass than through air, a converging lens converts a plane wave to a spherical wave.

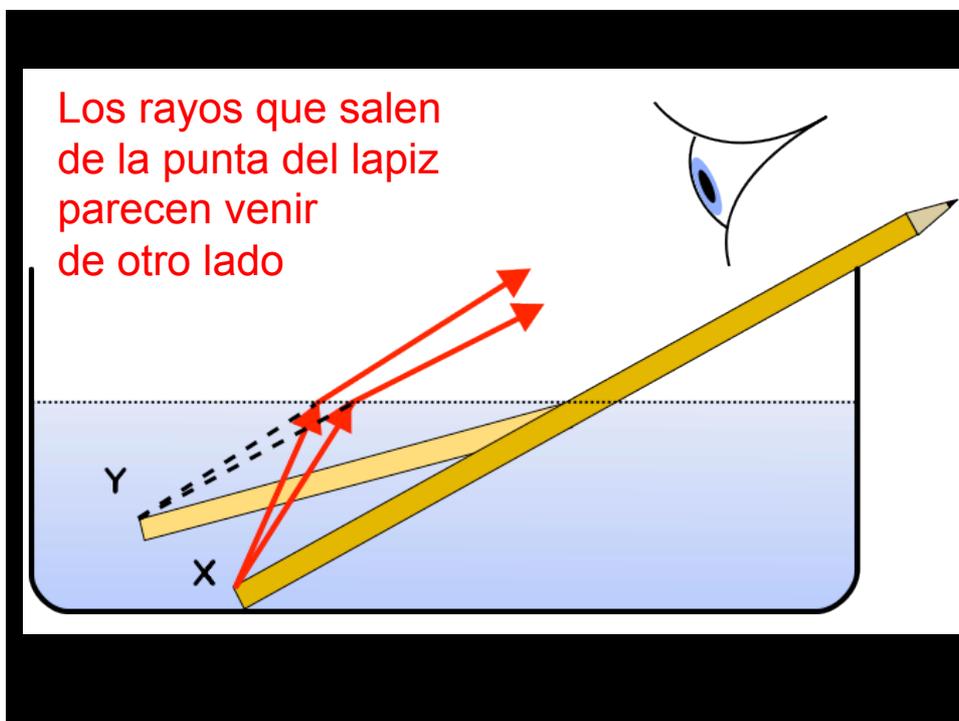
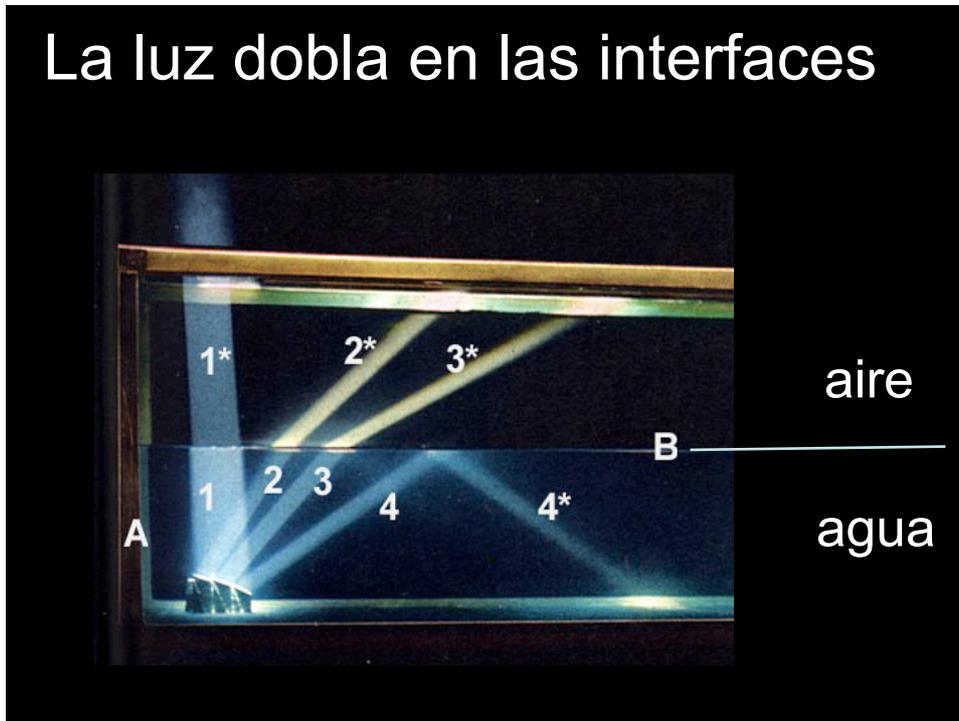


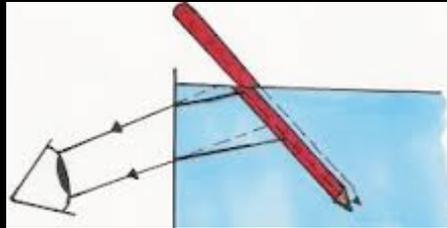
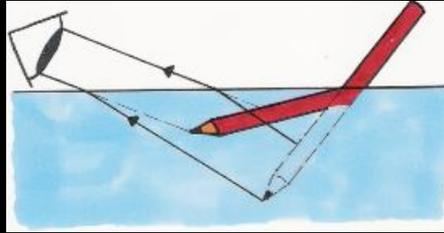
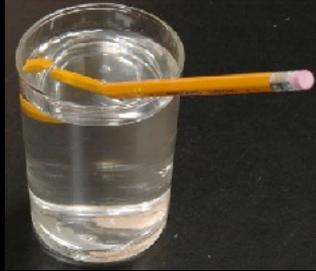
¿el lápiz se dobla?

¿el lápiz se quiebra?



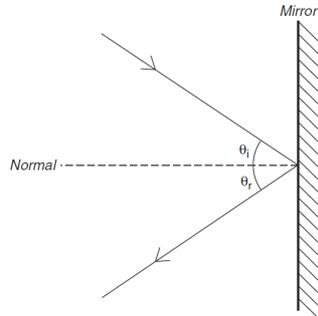
# La luz dobla en las interfaces





## Óptica Geométrica

Reflexión en una superficie plana:



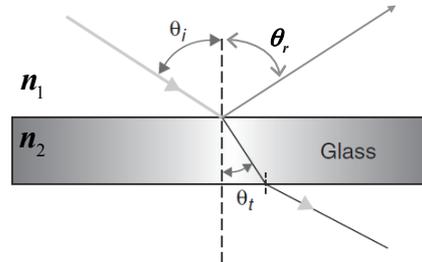
Reflexión

Ley de Snell

Índice de Refracción

Ejemplos de  $n$  (589nm):

Refracción de luz (superficies de  $\neq n$ ):



$$\theta_i = \theta_r$$

$$n_i \times \text{sen}(\theta_i) = n_t \times \text{sen}(\theta_t)$$

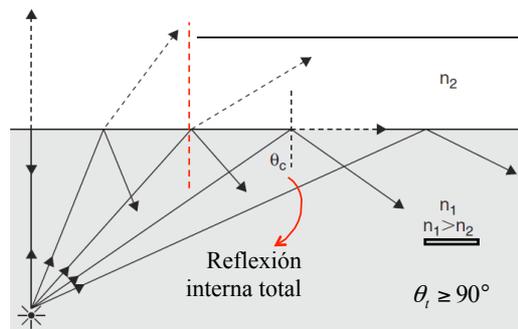
$$n_{\text{medio}} = c_{\text{vacío}} / c_{\text{medio}} \geq 1$$

Vacío	1,000	Vidrio	1,5-1,8
Aire	1,000	Glicerol	1,475
Agua	1,333	Aceite	1,515

## Óptica Geométrica: aplicaciones



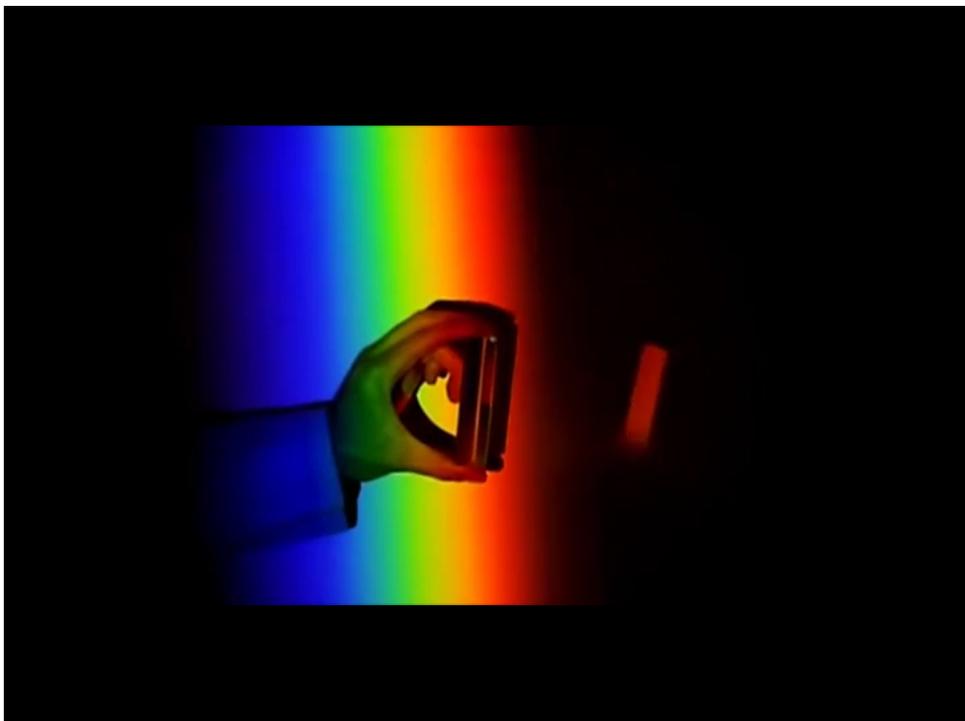
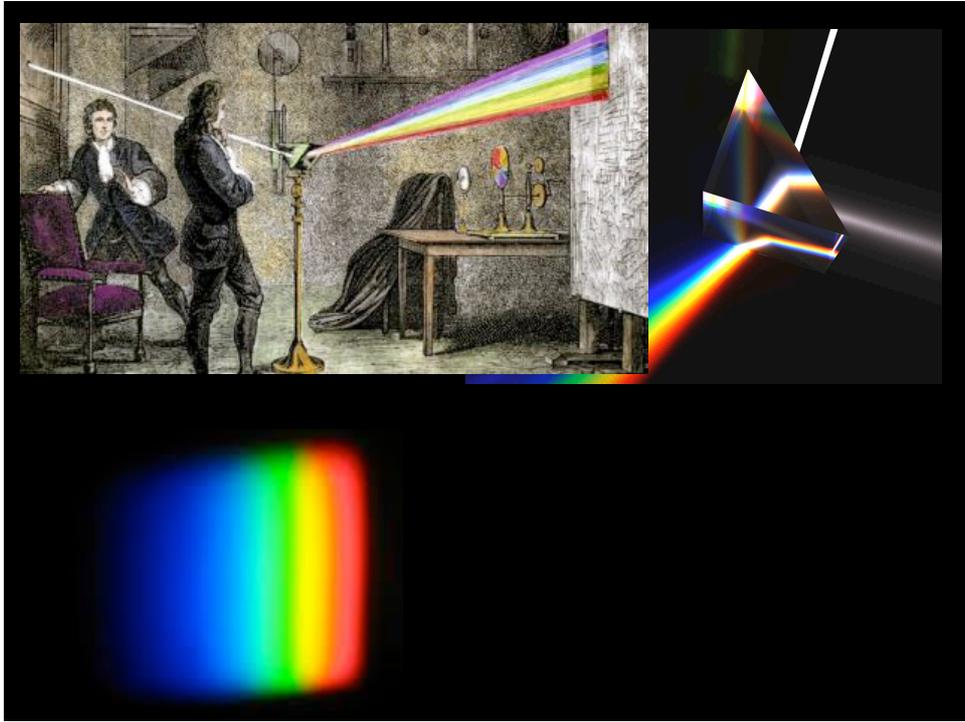
$n$  depende de  $\lambda$ : dispersión de colores (aberraciones cromáticas en lentes, monocromadores, etc).



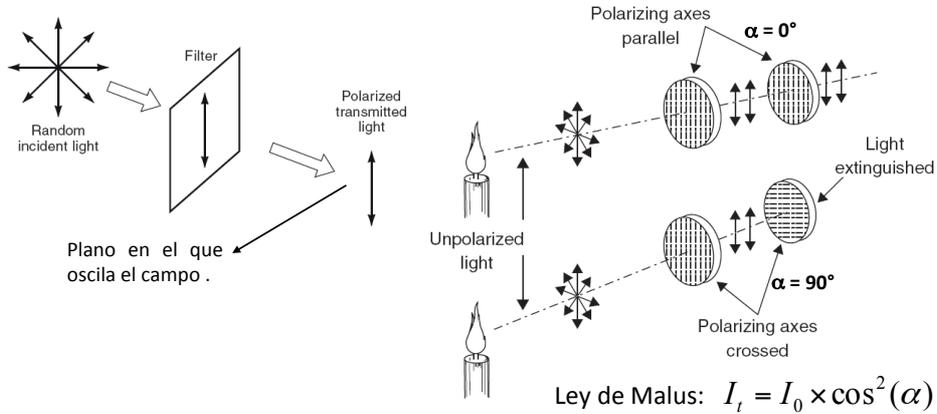
Los haces se alejan de la normal al pasar a un medio de mayor  $n$ .

Solo cuando paso de un mayor a un menor índice de refracción.

Se usa por ejemplo para iluminar con la onda evanescente en TIRF.



## La luz es una onda transversal: Polarización



### Polarizadores lineales:

solo dejan pasar la luz polarizada en una dirección (eje del polarizador).

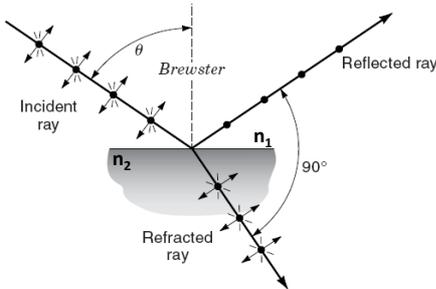
### Retardadores:

Introducen un retardo de fase entre las componentes, permitiendo cambiar la polarización de un haz.

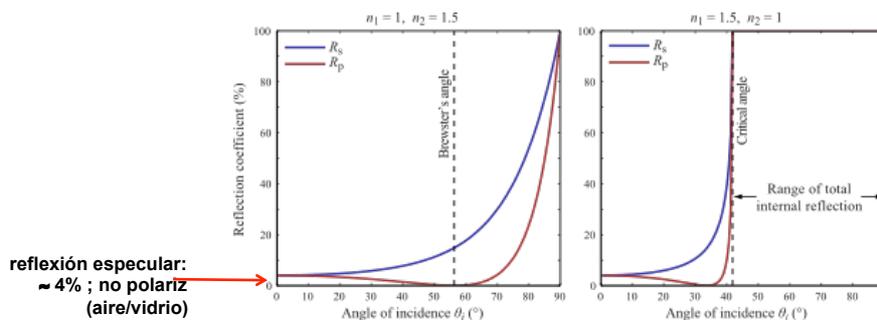
Lámina de  $\frac{1}{2}$  onda ( $\pi$ ): rota el plano  $90^\circ$ , o el sentido de una circular.

Lámina de  $\frac{1}{4}$  de onda ( $\pi/2$ ): convierte lineal en circular y viceversa.

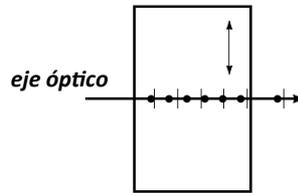
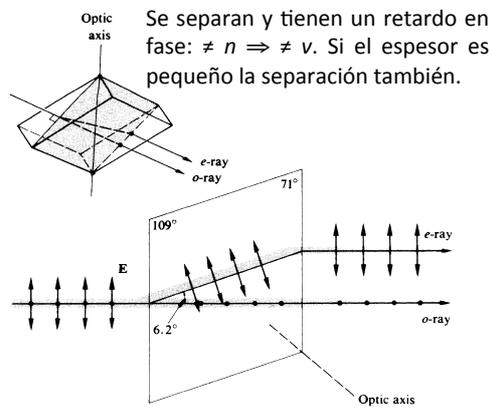
## Reflexión y refracción afectan la polarización



La luz **reflejada** y **refractada** están parcialmente polarizada. La luz **reflejada** en general está preferentemente polarizada paralela a la superficie. A mayor  $\theta$  menos componente perpendicular. En el ángulo de Brewster, cuando el haz reflejado y refractado forman un ángulo de  $90^\circ$  ( $\text{tg } \theta_B = n_t / n_i$ ), la luz reflejada está linealmente polarizada.



**Birrefringencia:** materiales ópticamente anisotrópicos tienen índices de refracción distintos para cada dirección. Por lo tanto un haz que ingresa a un material birrefringente, se separa en dos componentes con polarización perpendicular.



No se separan, pero tienen un retardo en fase:

$$\delta = 2\pi\Delta/\lambda$$

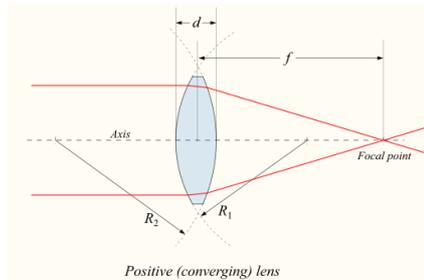
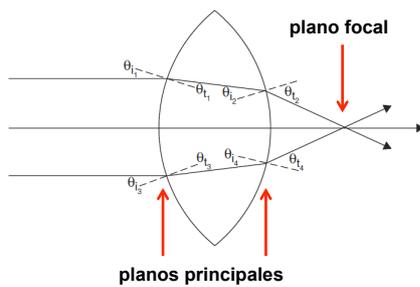
$$\Delta = (n_e - n_o)l$$

Figure 8.19 A light beam with two orthogonal field components traversing a calcite principal section.

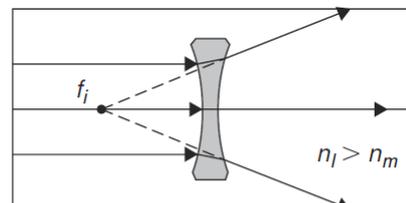
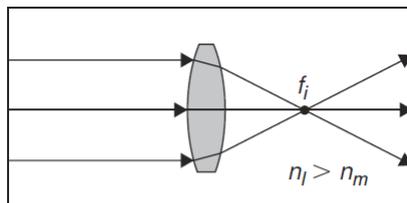
Además de algunos cristales (calcita) ciertas estructuras biológicas (actina, miosina, ensamblados de DNA, etc.) poseen una alta birrefringencia, debido a un ordenamiento de ensamblados macromoleculares de dimensiones comparables a la longitud de onda.

### Lentes y Formación de Imágenes por Refracción:

Lente: dos superficies refractoras

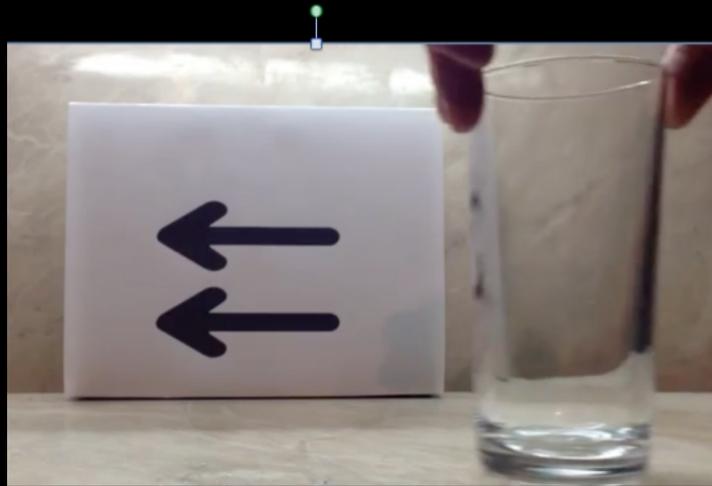


Punto focal ( $f$ ) (lentes delgadas:  $d \ll R$ ):  
 $1/f = ((n_l/n_m) - 1)(1/R_1 - 1/R_2)$

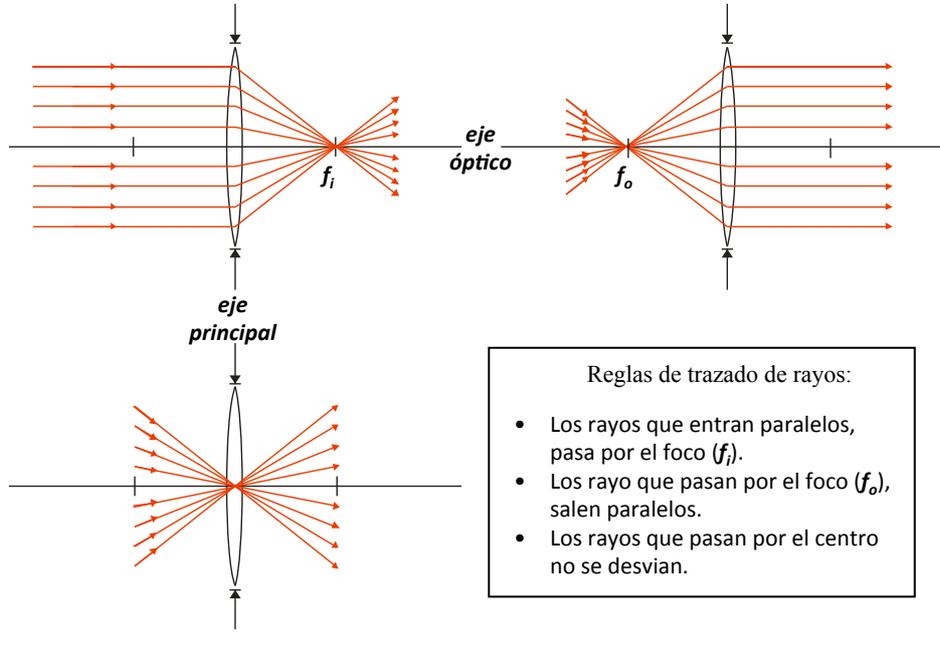


## Experimento Casero

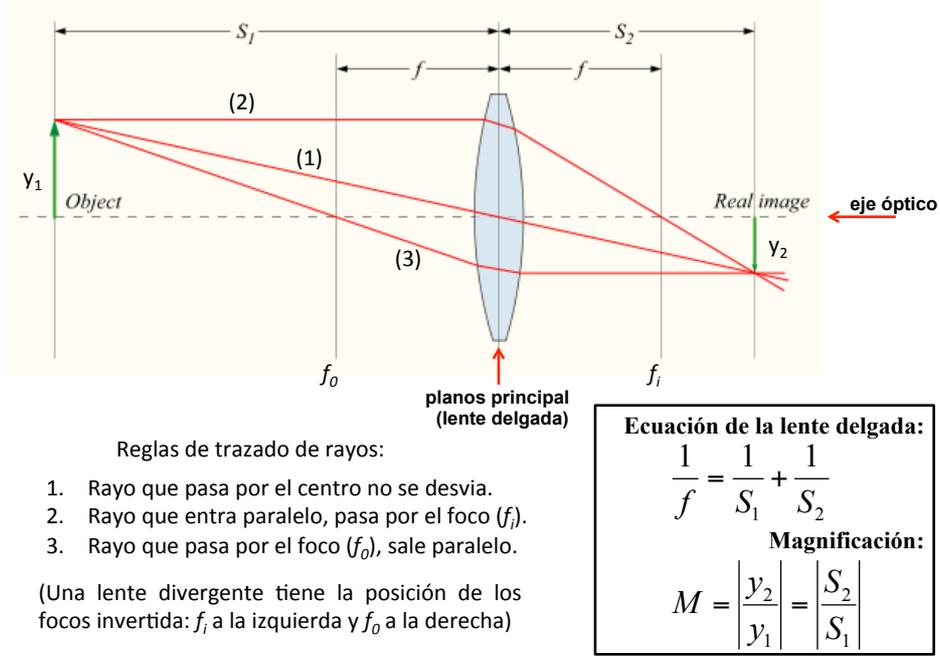
- Vaso de vidrio
- Hoja con flechas
- Agua



### Lentes y Formación de Imágenes por Refracción:

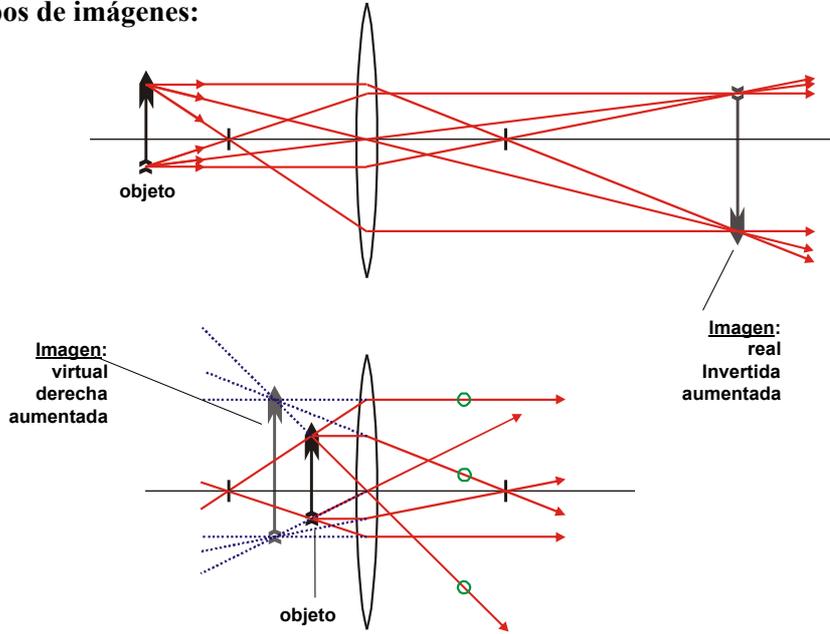


### Lentes y Formación de Imágenes por Refracción:

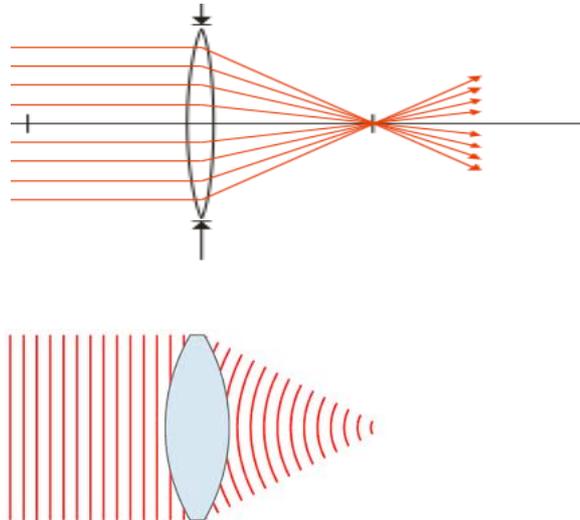


### Lentes y Formación de Imágenes por Refracción:

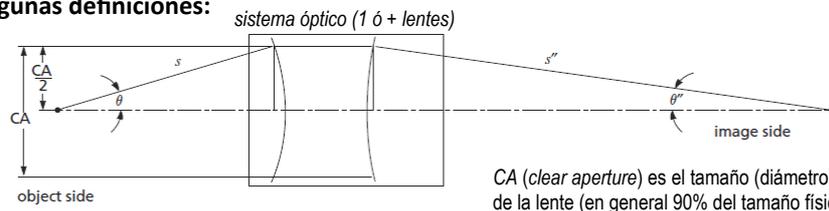
#### Tipos de imágenes:



### Lentes como filtros de fase



**Algunas definiciones:**



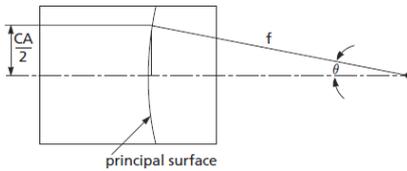
CA (clear aperture) es el tamaño (diámetro) útil de la lente (en general 90% del tamaño físico).

$$NA_o = \frac{CA}{2s_o} \quad NA_i = \frac{CA}{2s_i}$$

$$M = \frac{s_i}{s_o} = \frac{NA_o}{NA_i}$$

En general, al aumentar **CA** colecto mas luz (imagen más brillante), pero la relación entre **M** y **NA** impone un límite. Por ejemplo, en muchas aplicaciones de iluminación como enfocar la fuente de luz en una apertura (e.g. Acoplar a una fibra óptica), tienen una de las **NA** fija. Una vez elegida la **M**, se fija la **CA** (aumentarla encarece pero no mejora el proceso).

En general la **NA** de una lente se define independientemente de la posición del objeto:

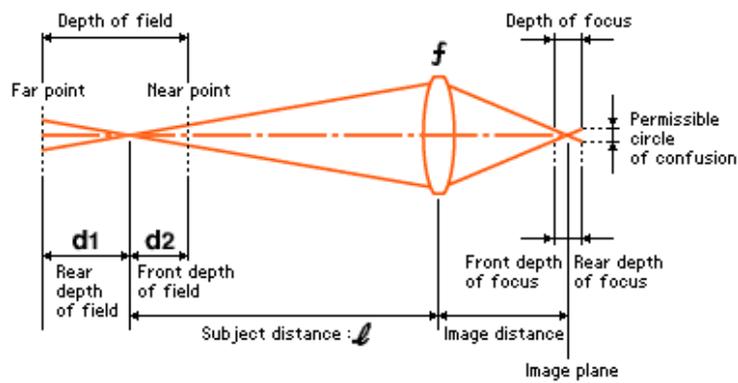


$$NA = n \sin(\theta) = \frac{CA}{2f}$$

$$f - \text{number} = \frac{f}{CA}$$

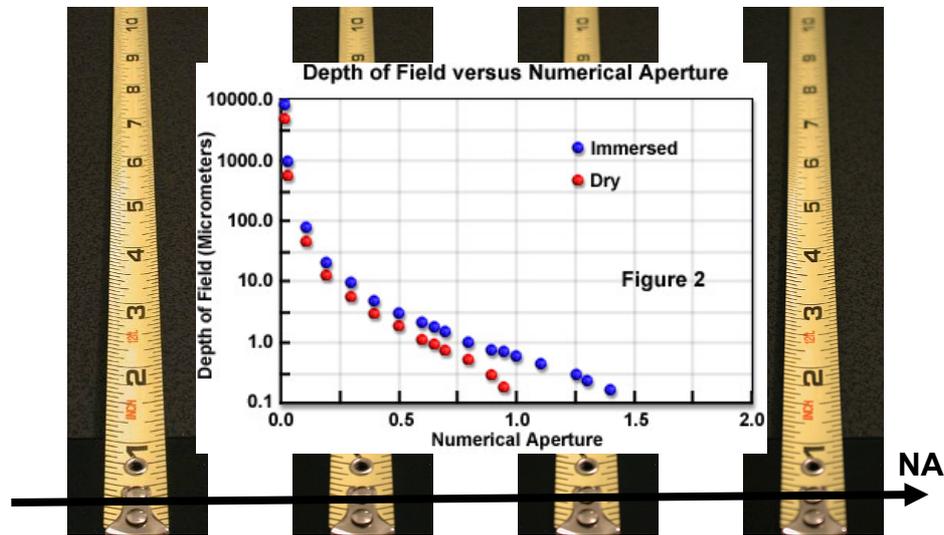
$$NA = \frac{1}{2(f - \text{number})}$$

Para cada sistema generador de imagen, existe un rango en el cual se puede observar un objeto y producir una imagen bien definida (definición arbitraria). Ese rango se lo define como **Profundidad de Campo**, en el espacio del objeto, y **Profundidad de Foco**, en el espacio de la imagen.



$$Z_{CAMPO} \approx \frac{n\lambda}{NA^2}$$

## Profundidad de Campo



<http://www.cs.mtu.edu/~shene/DigiCam/User-Guide/950/depth-of-field.html>

### Brillo:

El **brillo** de la imagen está determinado principalmente por el poder para coleccionar luz de la lente (el objetivo), y cuan grande es el área donde esa luz va a ser distribuida para formar la imagen.

$$\left[ \frac{\text{fotones}}{\text{area} \times t} \right] \quad B_{EPI-ILUM} \approx \left( \frac{NA^2}{M} \right)^2 \quad B_{TRANS-ILUM} \approx \left( \frac{NA}{M} \right)^2$$

En el sistema de iluminación, el brillo sólo depende de  $NA^2$  del condensador.

### Aperture Stop, Field Stop y Pupila

Un diafragma tiene distintos efectos dependiendo la posición que ocupa en el camino de la formación de la imagen:

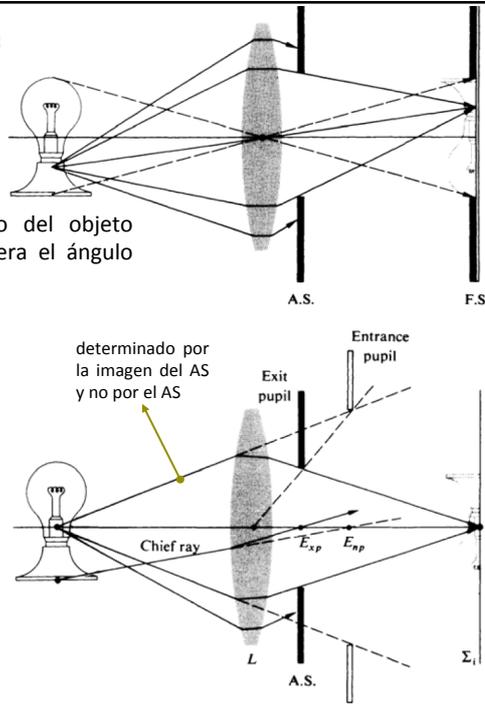
**Field stop:** determina el tamaño máximo del objeto observable (campo de visión), pero no altera el ángulo máximo de los rayos (no modifica la *NA*).

**Aperture stop:** limita el ángulo máximo de los rayos (de cada punto del objeto) que entran al sistema (modifica la *CA* & *NA* de la lente, y el brillo de la imagen).

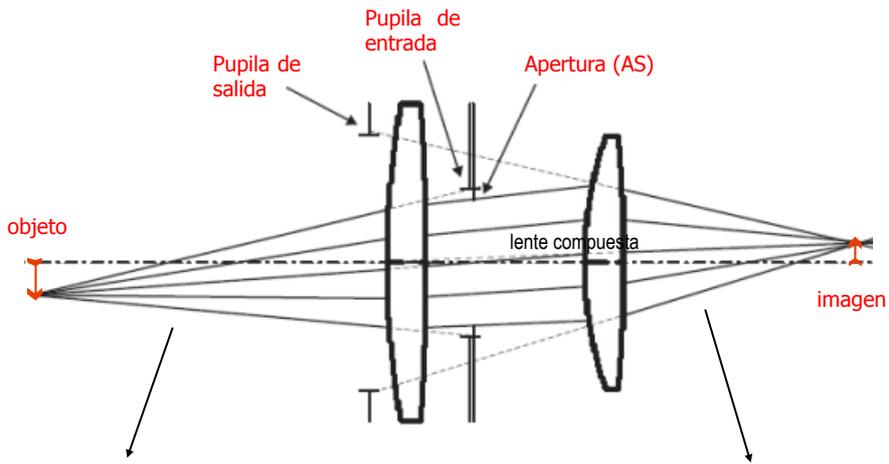
Las pupilas, son la imagen del **aperture stop**, formada por la lente (o el sistema).

**Pupila de entrada:** imagen del **AS** observado desde el objeto (solo cuentan las lentes que están antes).

**Pupila de salida:** imagen del **AS** observado desde la imagen (solo cuentan las lentes que están después).



### Importancia de las Pupilas:

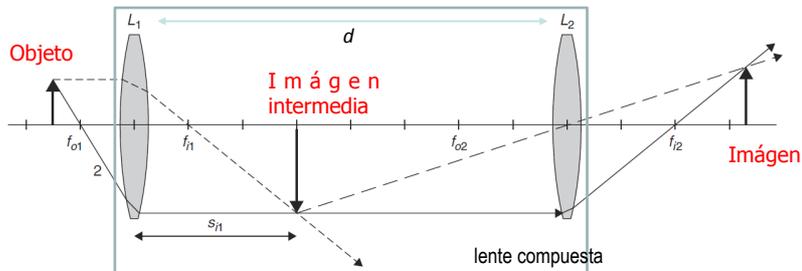


Los rayos que entran al sistema (de cada punto del objeto) parecen venir de la pupila de entrada

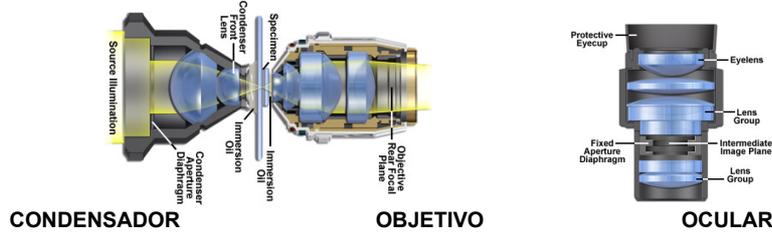
Los rayos que salen del sistema parecen venir de la pupila de salida

### Lentes compuestas:

Casi todas las lentes que componen un microscopio (objetivo, ocular, condensador) poseen más de una lente. Las imágenes formadas por un sistema de lentes se encuentran siguiendo las mismas reglas, procediendo lente por lente (la imagen de cada lente se utiliza como objeto de la siguiente lente).

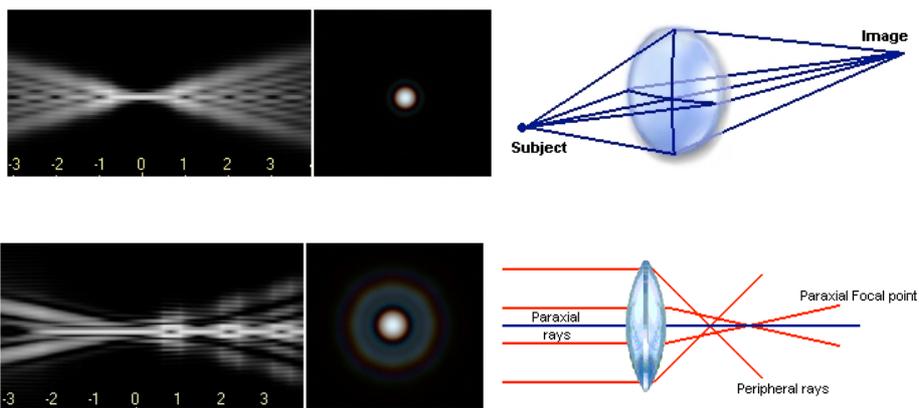


Magnificación total:  $M_{LC} = M_1 \times M_2$

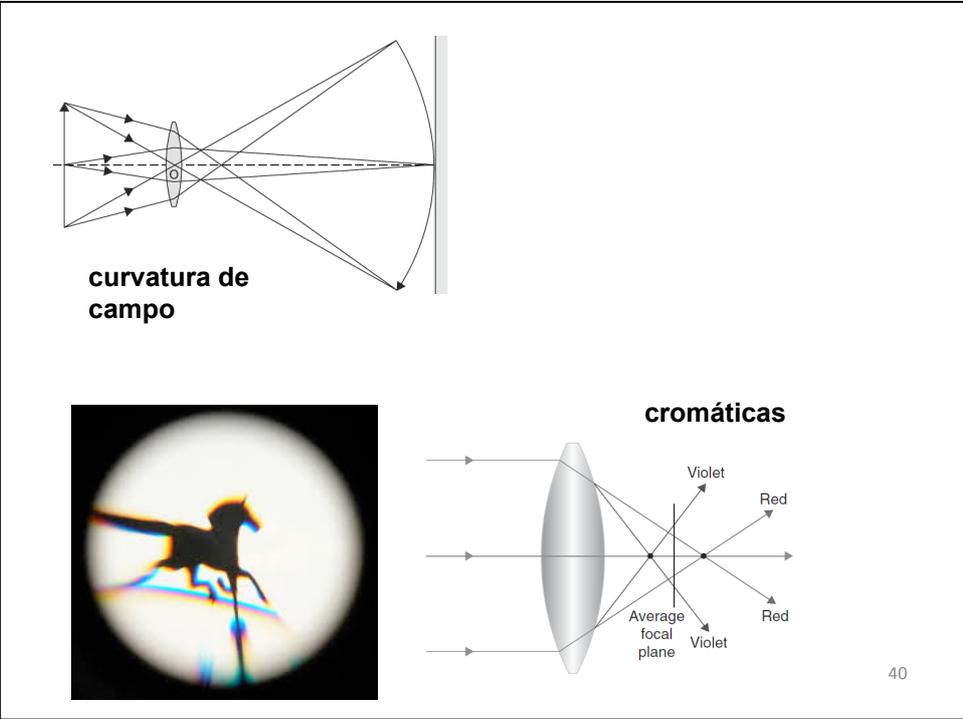
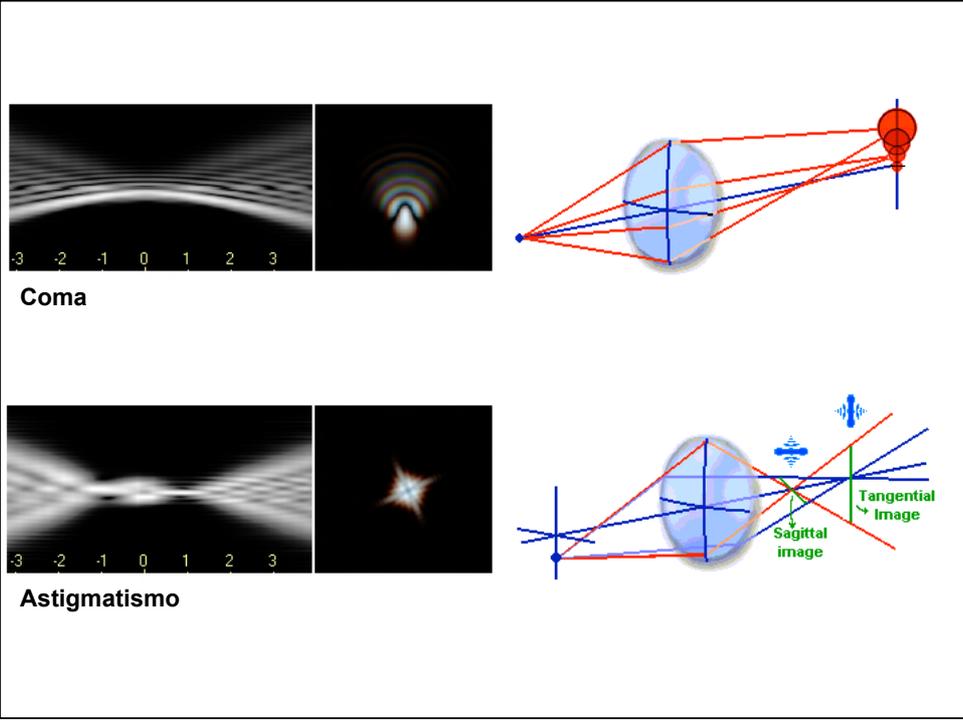


### Aberraciones:

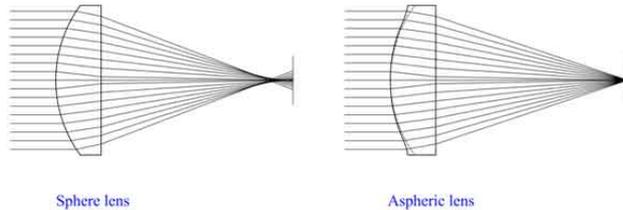
Las lentes no son perfectas y suelen generar imágenes distorsionadas (inducidas por las superficies curvas de la lente). Dos tipos de aberraciones particularmente importantes en microscopía, especialmente para el objetivo son las aberraciones esféricas y las cromáticas.



Aberraciones Esféricas



Las formas de corregir aberraciones es utilizar más de una lente, especialmente con distintos materiales que compensen los efectos, o lentes de curvatura esférica.

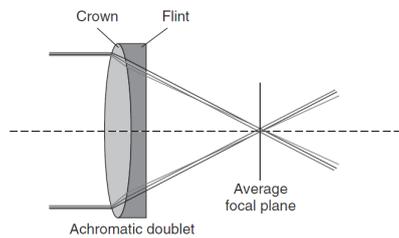


Sphere lens

Aspheric lens



esféricas



Achromatic doublet

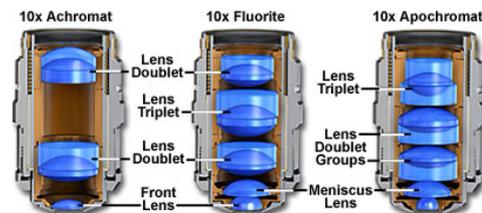


achromats

**FIGURE 2-36** Chromatic aberration can be reduced by combining a diverging lens made of flint glass with a converging lens made of crown glass. Because the flint glass has a greater dispersion than the crown glass, the chromatic aberration produced by the crown glass is reduced more than the magnification produced by the crown glass is reduced.

## Objetivos

Los objetivos están corregidos para minimizar aberraciones, conteniendo siempre más de una lente; otra parte de las aberraciones se compensan o corrigen en la lente de tubo (o en el ocular)

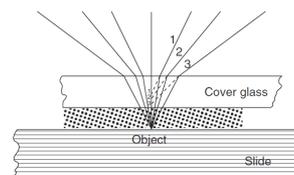


	Objetivo	Aberraciones Esféricas	Aberraciones Cromáticas	Curvatura de Campo
> Corrección > NA > Precio	Achromat	1 Color (546nm)	2C (486 & 656 nm)	No
	Plan Achromat	idem	idem	Si
	(Plan) Fluorite	3-4 Colores	2-4 Colores	(Si) No
	(Plan) Apochromat	3-4 Colores	4-5 Colores	(Si) No

**Plan-Apochromat:** Buenas para fluorescencia, especialmente con más de un color. *NA* max. 1,4.

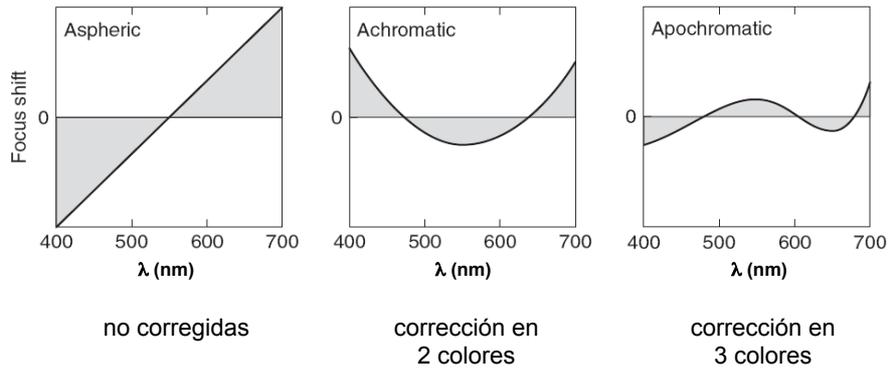
**Fluorite:** alta transparencia (UV), imagen brillante (pocos elementos), aberraciones cromáticas bien corregidas. *NA* max 1,3. Ideales para inmunofluorescencia.

El cubre introduce aberraciones esféricas; los objetivos también corrigen esto (a veces se puede corregir espesores variable).



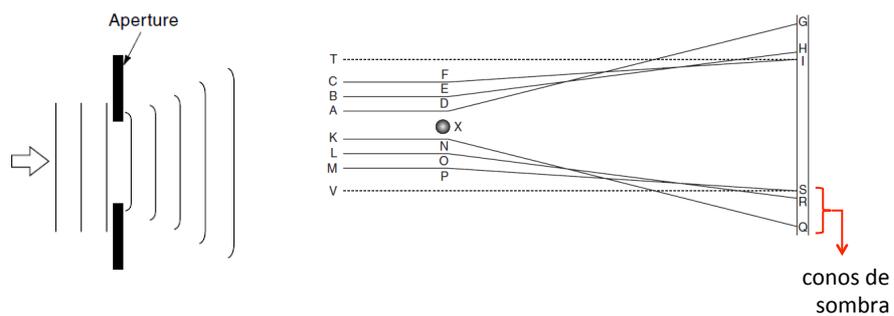
## Corrección de aberraciones cromáticas en objetivos:

Posición relativa del foco en función del color (longitud de onda) de la luz:



## Difracción e Interferencia:

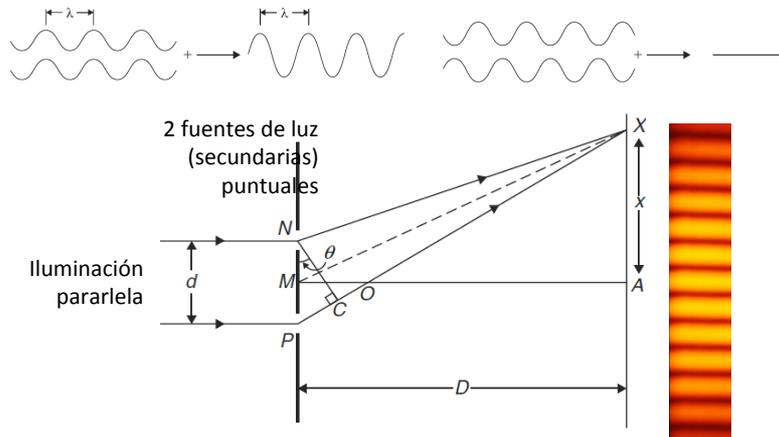
Al pasar por una abertura pequeña o al encontrarse con un objeto pequeño (del orden de  $\lambda$ ), se observa una curvatura de la luz (del frente de ondas) o una dispersión de los rayos.



En un microscopio, la difracción se produce principalmente al iluminar un objeto pequeño (en la muestra), y cuando la luz pasa por la apertura de una lente (el objetivo). Estos fenómenos determinan la formación de la imagen en un microscopio de campo lejano (*far field*).

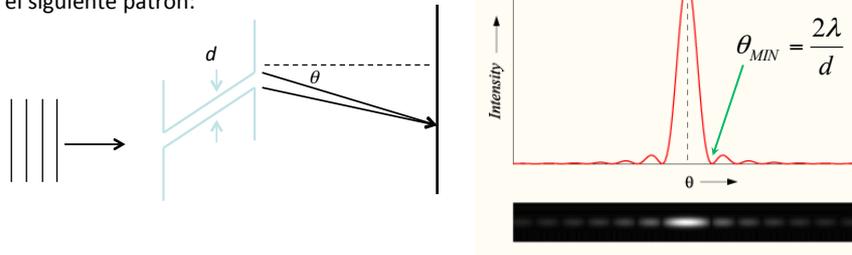
## Difracción e Interferencia:

La interferencia se produce al recombinar dos haces difractados (difracción e interferencia son manifestaciones del mismo proceso). Es constructiva si están en fase ( $2n\pi$ ), y destructiva si tienen fases opuestas ( $(2n+1)\pi$ ).



La diferencia de camino óptico ( $PC$ ) determina si la interferencia es constructiva o destructiva. Si  $PC = n\lambda$  ( $n = 0, 1, 2, \dots$ ) es un máximo (constructiva); si esta corrido media onda es un mínimo. El patrón de interferencia visto a una distancia grande ( $D$ ) o en el plano focal de una lente es de tipo *Fraunhofer*.

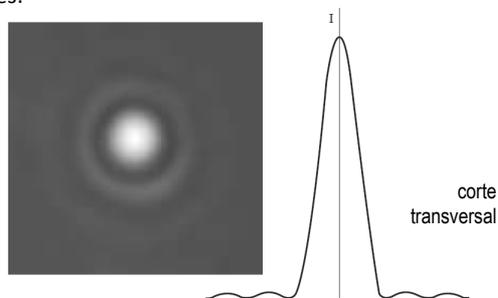
El mismo experimento con una sola ranura da el siguiente patrón:



Si la ranura es circular, el patrón de difracción se observa en dos dimensiones: patrón de difracción de **Airy**.

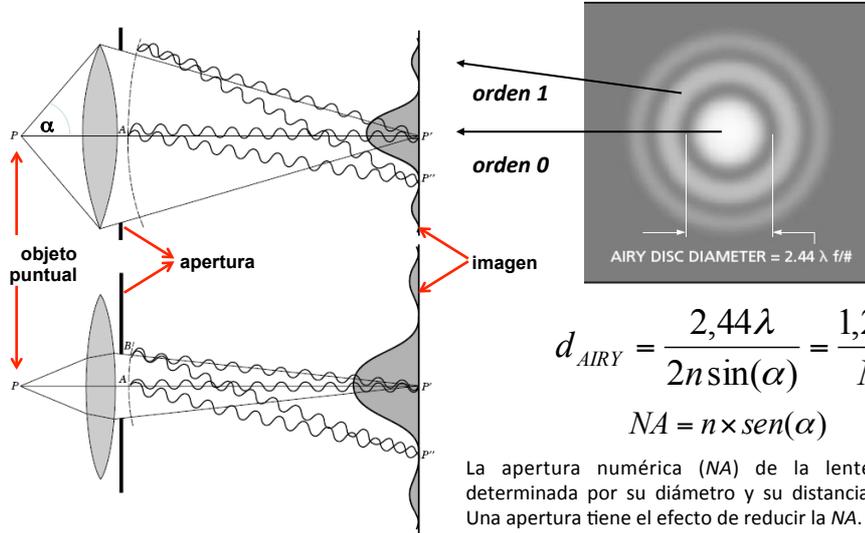
El círculo central contiene el 84 % de la luz que pasa por la ranura (o un objeto puntual luminoso).

El diámetro del primer anillo de intensidad cero se lo conoce como el *Disco de Airy (Airy Disk)*.



La separación de los máx/min en el plano dependen de la distancia a la que se observan ( $D$ ).

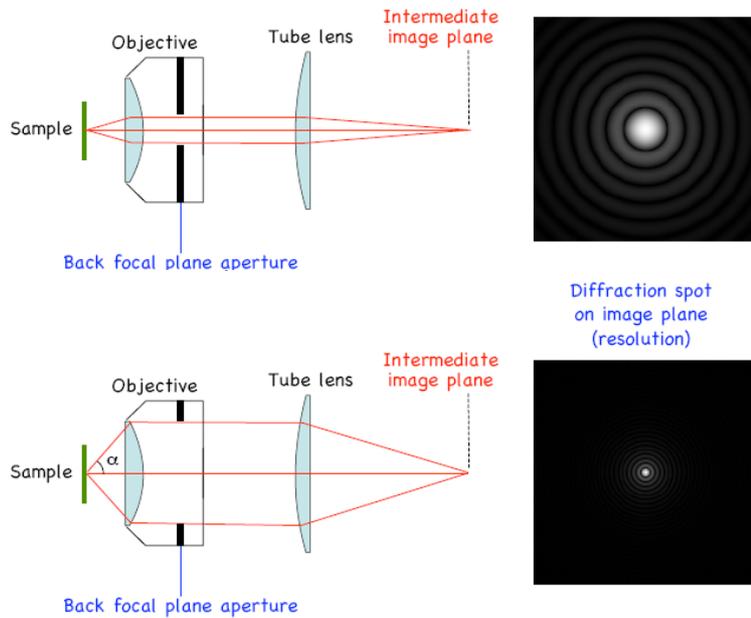
Una **lente** recorta el frente de ondas; es decir que forma la imagen solo con los haces colectados por la lente. Por lo tanto se comporta como una apertura (circular). En este caso, el patrón de interferencia se observa en la imagen.



La apertura numérica (NA) de la lente está determinada por su diámetro y su distancia focal. Una apertura tiene el efecto de reducir la NA.

El efecto de enfocar luz con lentes convencionales (*far field*), tanto para iluminar como para tomar una imagen, está limitado por el fenómeno de la difracción.

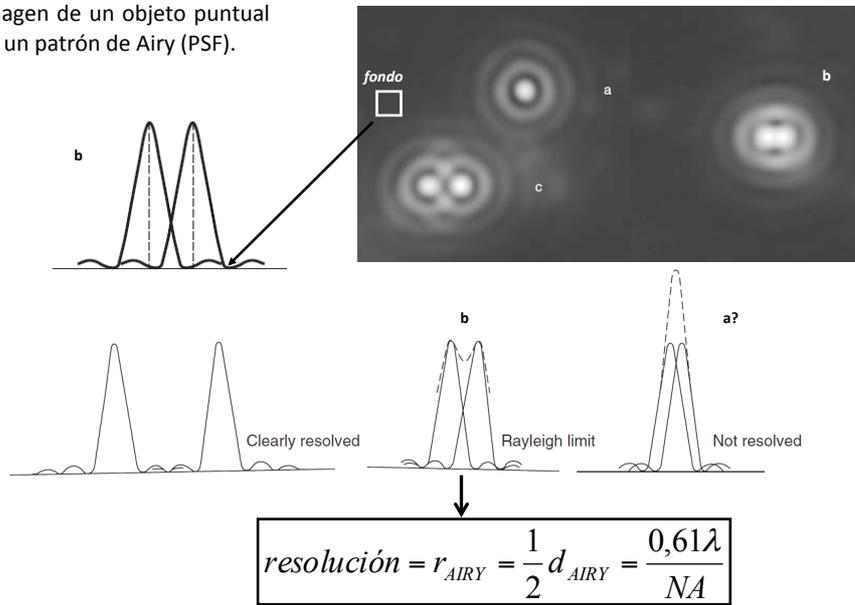
En el caso de un objetivo:



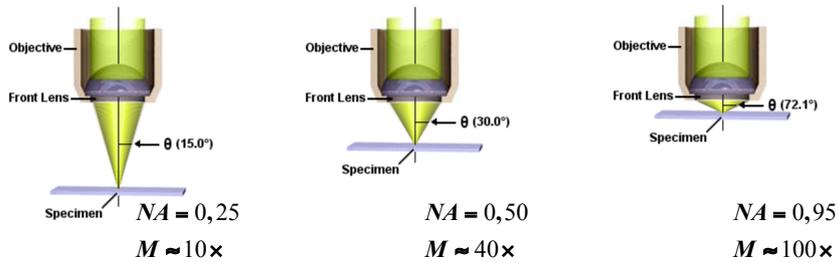
## Resolución y Contraste

Debido a la difracción, la imagen de un objeto puntual es un patrón de Airy (PSF).

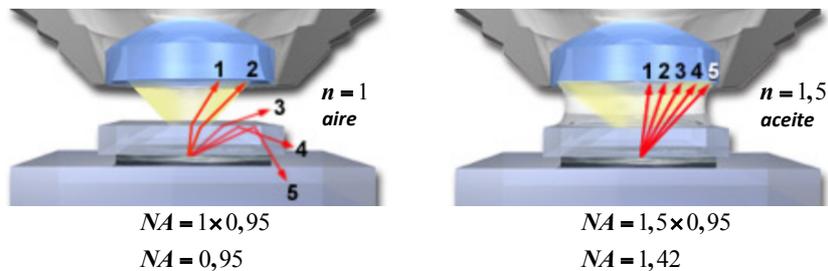
$$\text{contraste (\%)} = \frac{(I_{\text{FONDO}} - I_{\text{IMAGEN}})}{I_{\text{FONDO}}} \times 100$$



## Resolución y NA del Objetivo:

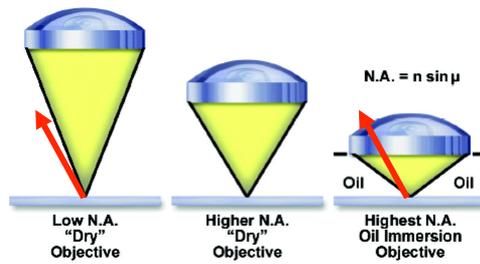


En la práctica, el ángulo máximo está limitado a  $\approx 72^\circ$ , lo cual fija un límite de  $NA = 0,95$  para objetivos de aire. La mayoría de los aceites de inmersión tienen un  $n = 1,5$  y por lo tanto  $NA = 1,42$ .



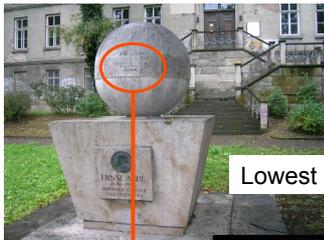
## Objectives: Apertura Numérica

Un microscopio es un filtro pasa bajos



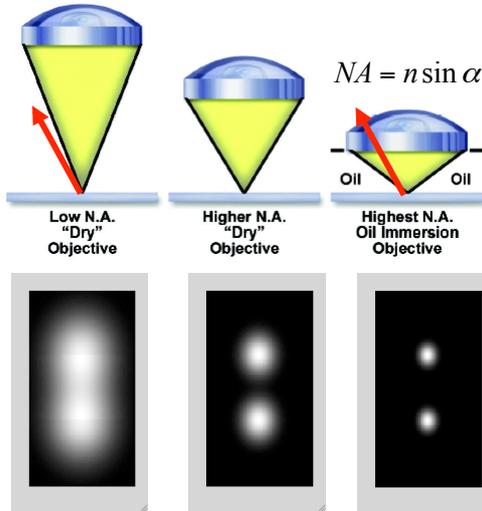
## Objectives: Numerical Aperture

Ernst Karl Abbe



Lowest NA

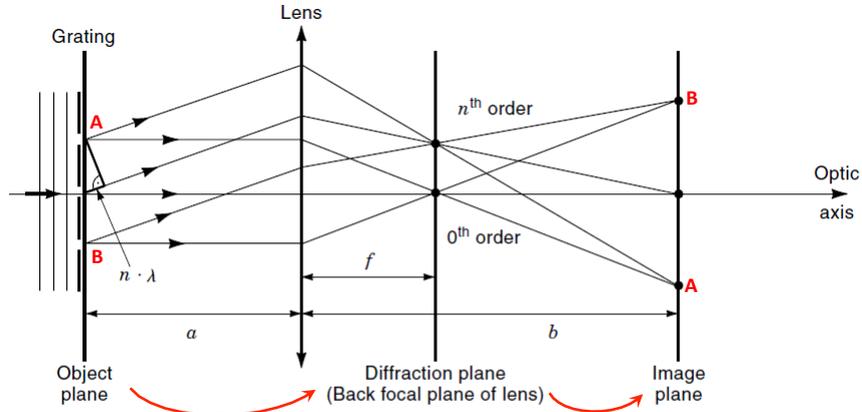
$$d = \frac{\lambda}{2 N.A.}$$



Mayor NA

Mas Luz y mas detalles(=Information)

### FORMACION DE IMÁGENES: experimento de Ernst Abbe (1873).



El objeto difracta la luz, la lente la colecta y forma el patrón de difracción en el plano focal (mueve el patrón de difracción del infinito – frente de ondas plano – al foco). El patrón de difracción es la FT (directa) del objeto (*OTF*); cada punto de este patrón se recombina, es decir que vuelve a interferir (FT inversa) en el plano de la imagen (*PSF*). Para formar imagen, **se debe colectar al menos dos órdenes de difracción** ( $n = 0$  &  $1$ ). La *NA* determina cuántos órdenes se usan (filtro pasa bajos) para formar la imagen. Cuántos más órdenes colecta, mayor es la resolución (detalle en la imagen).

### FORMACION DE IMAGENES

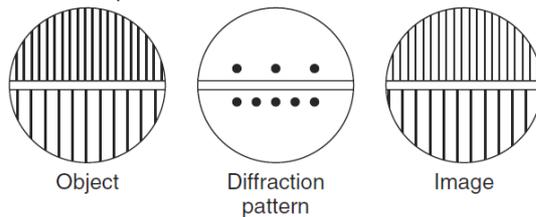
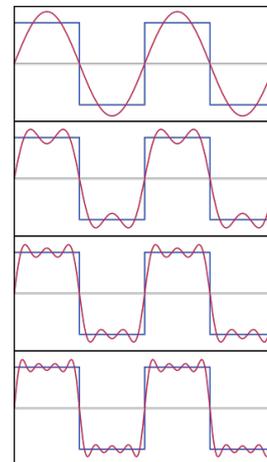
El teorema de Fourier permite descomponer una función periódica como una serie de senos y cosenos. Para una onda cuadrada:

$$f(x) \approx \frac{1}{1} \sin(1kx) + \frac{1}{3} \sin(3kx) + \frac{1}{5} \sin(5kx) + \dots$$

cuantos más armónicos se utilizan, mejor es la descripción.

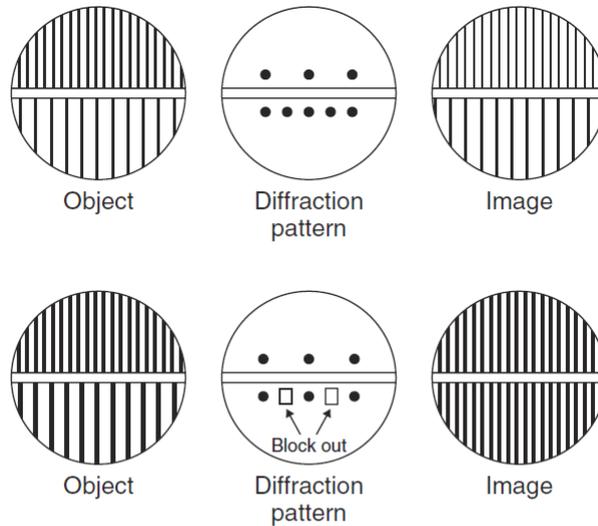
El mismo principio se aplica a la formación de imágenes. Los **términos de la FT** corresponden a los **órdenes de interferencia** en el plano focal. Una imagen perfecta requiere infinitos órdenes (términos).

Objetos (estructuras) separados distancias cortas tienen los órdenes más separados (en el plano focal o de interferencia), y requieren de lentes con mayor *NA* para su correcta descripción.



## FORMACION DE IMAGENES

Abbe además modificó el patrón de interferencia en el plano focal (bloqueando selectivamente algún orden), y observó como se modificaba la imagen formada.



## RESOLUCION

Distancia mínima entre dos objetos (idénticos) que puede distinguir el microscopio

Para formar la imagen, la lente debe captar como mínimo el primer orden de difracción. El ángulo correspondiente a ese haz está determinado por la longitud de onda de la luz y la separación entre los objetos :

$$\sin(\theta) = \lambda/d$$

El ángulo ( $\alpha$ ) máximo que se capta con una lente, para una muestra en el foco está determinado por  $f$  y  $D$  (o su  $NA$ ):

$$\operatorname{tg}(\alpha) \approx \sin(\alpha) = \frac{D/2}{f} = NA \quad (\text{aire: } n = 1)$$

Igualando ambos ángulos:

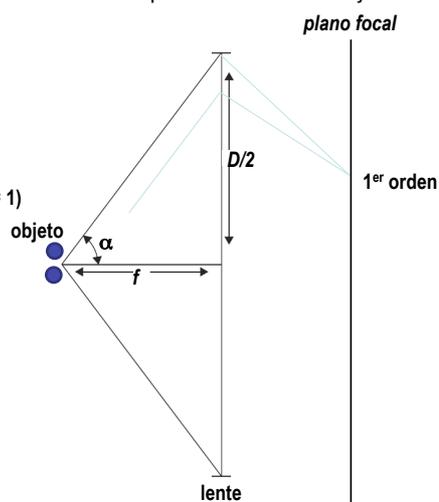
$$d = \lambda/NA$$

Si la iluminación es oblicua (Koeller):

$$d = \lambda/2NA$$

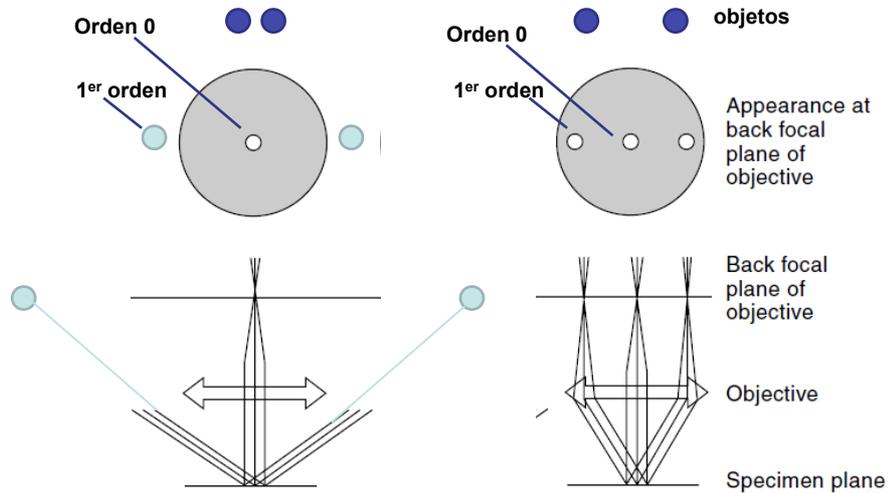
Utilizando el criterio de Rayleigh:

$$d = 1,22 \lambda/2 NA$$

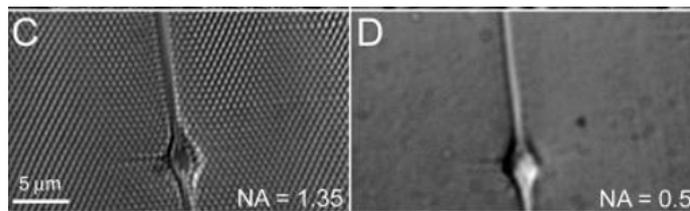


## RESOLUCION

Distancia mínima entre dos objetos (idénticos) que puede distinguir el microscopio.



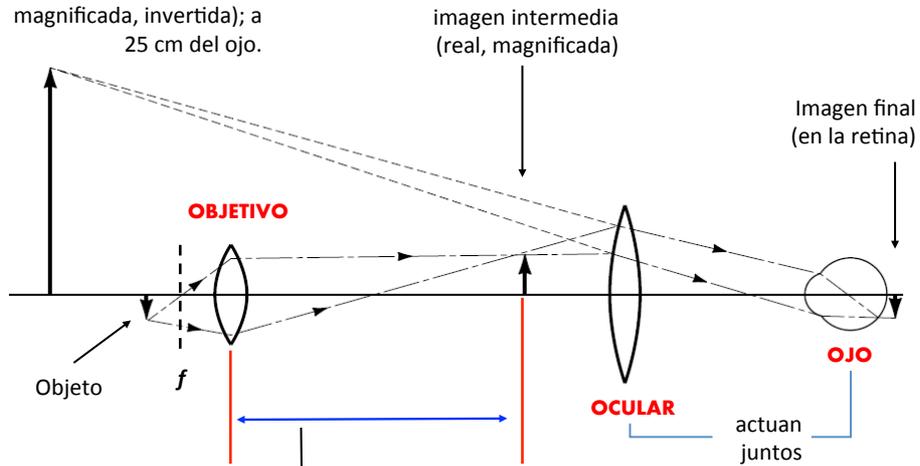
## La importancia del objetivo en microscopía óptica



Las dos imágenes fueron tomadas con objetivos 40x...qué está pasando?  
Cual es la menor distancia que podemos resolver en el microscopio?

## MICROSCOPIO COMPUESTO

Imagen del ocular (virtual, magnificada, invertida); a 25 cm del ojo.

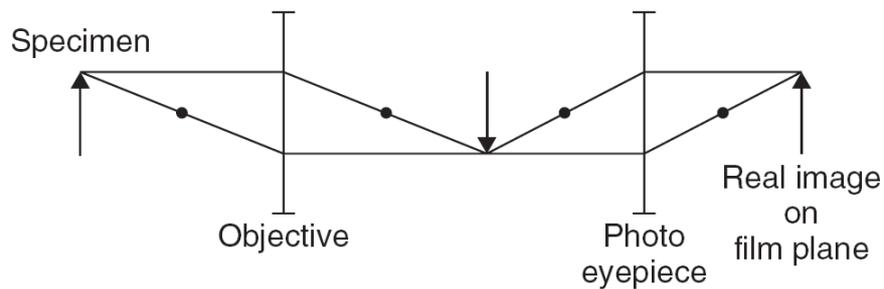


Normas 160 ó 170: la imagen intermedia se forma 160 mm (ó 170 mm) detrás del objetivo.

Enfocado: se mueve el objetivo (o el objeto) hasta formar la primer imagen en la posición justa, para formar la imagen en la retina.

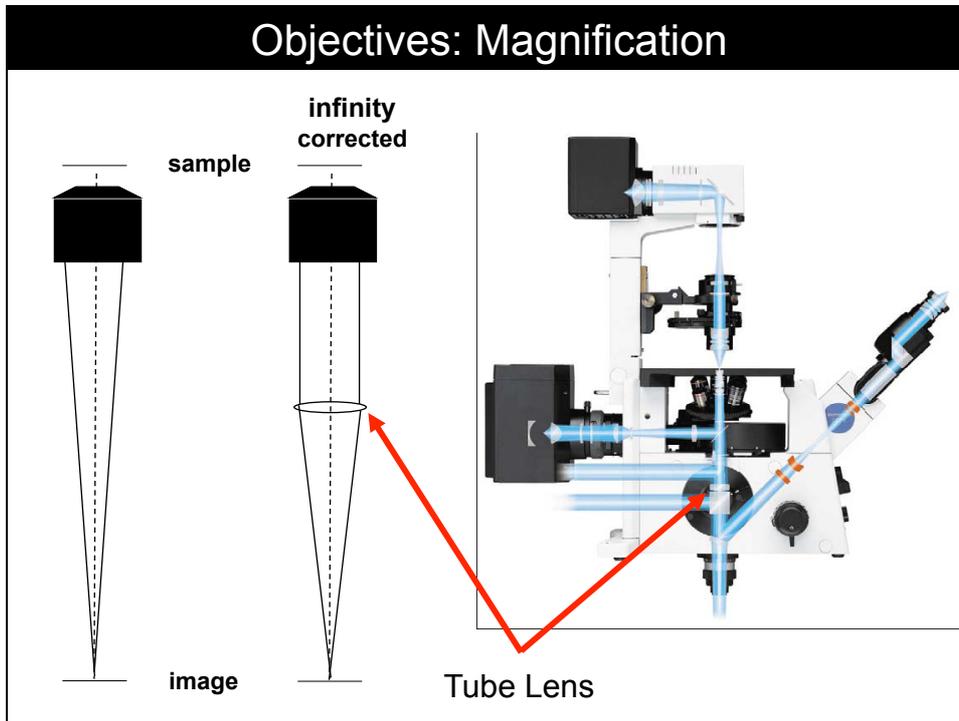
### Detección con cámaras:

La imagen que forma la lente ocular es virtual y no se puede proyectar directamente sobre un film o una CCD. En lugar del ocular, se usa una lente (de proyección) para realizar la imagen final en el plano del detector (film, CCD, etc.). La magnificación total también la determinan ambas lentes.



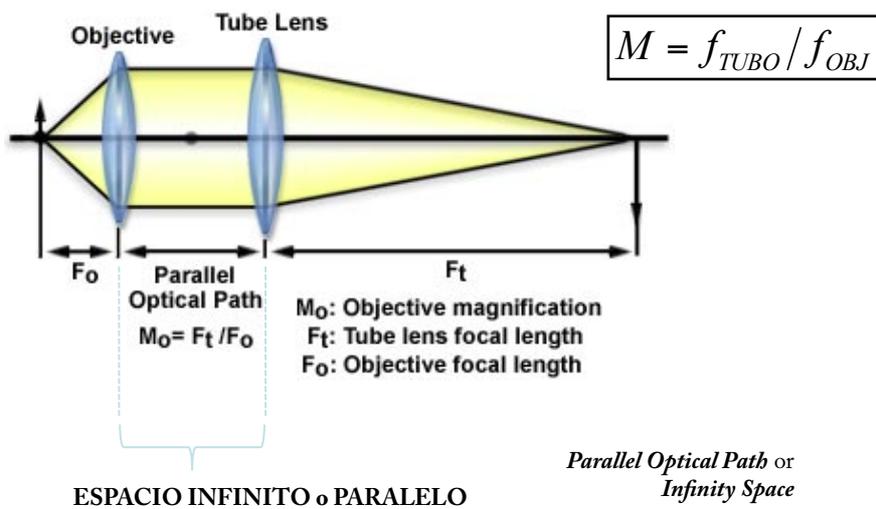
Ejercicio: por qué en este ejemplo no hay magnificación? ( $M_{TOT} = M_1 = M_2 = 1$ )

## Objectives: Magnification



### SISTEMAS A INFINITO

Los microscopios más modernos utilizan el objetivo enfocado a infinito: el objeto es colocado en el foco, por lo que no se forma una imagen (la imagen del objetivo se forma en un plano en infinito). Una segunda lente (lente de tubo) forma una imagen real en su foco ( $f_2$ ). La magnificación la da el cociente de las distancias focales.



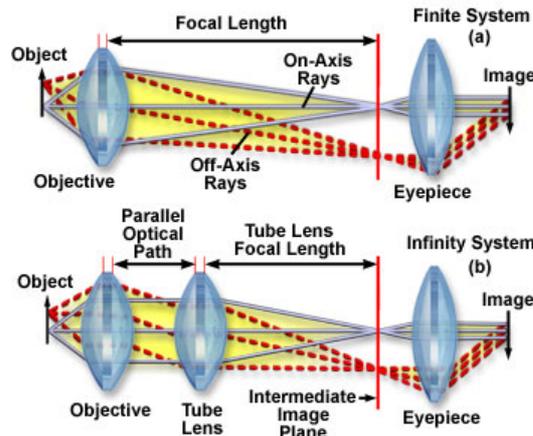
### SISTEMAS A INFINITO

La magnificación de los objetivos se informa en conjunto con la lente de tubo: depende del productor!!!

El conjunto [objetivo + lente de tubo] reemplaza al objetivo en un sistema finito.

Common Infinity Correction Tube Lengths

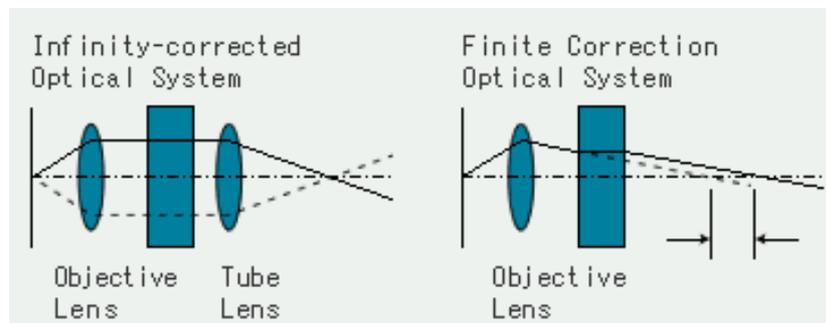
Manufacturer	Tube Length (millimeters)
Nikon	200
Olympus	180
Leica	200
Zeiss	164.5



Cada punto de la muestra resulta en un haz de rayos paralelos emergiendo del objetivo (en el espacio infinito).

### SISTEMAS A INFINITO: VENTAJAS

- Permite mucha **flexibilidad** en el diseño sin perder contraste ni resolución.
- La Magnificación NO depende de la distancia entre el objetivo y la lente de tubo.
- Se puede introducir varios elementos ópticos (polarizadores, retardadores, etc.) en el espacio infinito, sin importar su posición, con la ventaja de que:
  1. no se modifica la distancia parfocal
  2. no se producen corrimientos en la imagen
  3. no se introducen aberraciones esféricas
- Permite comparar directamente imágenes tomadas con distintas técnicas (DIC, Fluó, PC)



## NOCIONES BASICAS DE OPTICA

“Light and video microscopy”  
Randy Wayne

“Fundamentals of Light Microscopy and Electronic  
Imaging”  
Douglas E. Murphy

“Optics (4th Edition)”  
Eugene Hetch

“Fundamental Optics”  
Technical Guide Chapter  
Melles Griot - CVI

65