

## Sesión Teórico-Práctica 2 Fundamentos de Microscopía Óptica<sup>1</sup>

### PARTE TEÓRICA<sup>2</sup>

- 2.1. Fundamentos Técnicos de la Microscopía Óptica.
- 2.2. Tipos de Microscopía Óptica: Campo Claro, Campo Oscuro, Contraste de Fases, Contraste Interferencial "Nomarsky" (DIC).
- 2.3. La Microscopía Óptica y las Ciencias Forenses.

### Fundamentos Técnicos de la Microscopía Óptica

Antes de entrar a estudiar cuales son los fundamentos técnicos de la microscopía óptica, vamos a ver cuales son los elementos estructurales que constituyen un microscopio óptico (figura 1), teniendo como referencia un microscopio tipo estándar:

- **Lentes:** ocular (próxima al ojo) y objetivo (próxima a la muestra)
- **Platina:** plataforma donde se encuentra el portaobjetos de la muestra. Puede ser móvil en un plano (XY), por lo que puede tener asociado dos mandos que permitan el movimiento. La platina puede ser circular y tener una graduación en grados, lo cual es muy útil cuando se trabaja con luz polarizada en microscopios petrográficos.
- **Revolver:** Estructura circular donde se colocan los diferentes objetivo. También puede llevar asociados huecos para colocar filtros.
- **Anillos de enfoque:** macrométrico, para un ajuste grosero del foco, y micrométrico, para un ajuste fino del foco.
- **Condensador:** se encuentra debajo de la platina y está formado por una o un conjunto de lentes que condensan el haz luminoso sobre la muestra. En el condensador se colocan la mayoría de elementos que se interponen o filtran la luz con el fin de conseguir un contraste de la muestra. Dependiendo de los elementos que se interponen obtenemos los distintos tipos de microscopía óptica.
- **Diafragma:** se suele encontrar asociado al condensador y regula la entrada de luz a la muestra al cerrarse o abrirse unas piezas móviles (iris), de tal manera que el haz

---

<sup>1</sup> Este documento está sujeto a una licencia Creative Commons



<sup>2</sup> La procedencia y autoría de las imágenes y esquemas utilizados se encuentra al final del texto

luminoso tiene mayor o menor diámetro. Este sistema permite modificar la profundidad de campo de la muestra, es decir que el grosor de enfoque (eje Z) sea mayor o menor. También existe un diafragma en el cuerpo del estativo interpuesto a la fuente de luz, con el que se controla la cantidad de luz que llega al diafragma.

- **Estativo:** es el conjunto de piezas que sostienen y estabilizan el resto de elementos anteriormente citados.

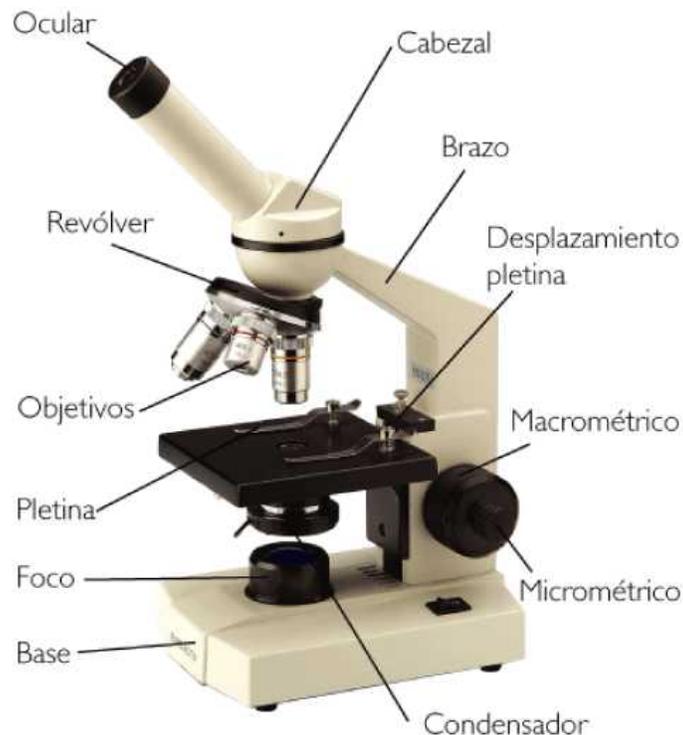


Figura 1. Partes de un microscopio óptico

Los parámetros técnicos que definen a la microscopía óptica convencional están asociados a las lentes (aumentos, distancia de trabajo, campo visual, o profundidad de campo), a la iluminación (longitud de onda), a la muestra (índice de refracción) o a la combinación de todos (poder de resolución):

- **Aumentos:** los aumentos de una lente vienen definidos por su tallado y, en el caso de lentes compuestas, por este factor y por la combinación de sus elementos ópticos. La capacidad de las lentes simples o compuestas para producir imágenes aumentadas esta relacionado con la refracción de las ondas luminosas al atravesar estas lentes.

- **Distancia de trabajo:** la distancia de trabajo es la separación que queda entre la muestra y el objetivo. A mayor distancia de trabajo mayor grosor de la muestra que se puede observar
- **Campo visual:** el campo visual es el área de la muestra que se puede observar con cada objetivo, el cual disminuye al incrementar los aumentos (lentes más pequeñas).
- **Profundidad de campo:** la profundidad de campo es el grosor de muestra que queda enfocada, es decir, teniendo como referencia un punto de enfoque en el eje z, la profundidad de campo consistiría en la cantidad de muestra que queda nítida por delante y por detrás de dicho punto de enfoque. La profundidad de campo viene definida con el aumento de la lente y ésta es menor conforme incrementamos el aumento, pero sus límites pueden corregirse ligeramente cerrando la abertura del diafragma, es decir la luz que le llega a la muestra. Esta última situación traería consigo un mayor contraste y por tanto una imagen más oscura.
- **Iluminación:** la naturaleza de la fuente de luz es muy importante, ya que puede incrementar o disminuir el poder de resolución (longitud de onda), pero también es esencial su intensidad y el tamaño del haz, ya que de esta forma se mejora el contraste, la profundidad de campo y el enfoque.
- **Índice de Refracción:** la luz viaja con una velocidad diferente dependiendo del medio en el que se propaga, que siempre es menor que la velocidad en el vacío. Por tanto, el índice de refracción viene a cuantificar dicha reducción y se define como el cociente entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad en el medio en el que se propaga ( $n = c/v$ ;  $n$ =índice de refracción,  $c$ =velocidad de la luz en el vacío,  $v$ =velocidad de la luz en un medio determinado). El índice de refracción en el aire es muy parecido al del vacío ( $n=1,00029$ ) por lo que se toma este como referencia. La ralentización de la luz al atravesar un medio se interpreta visualmente como un cambio en la dirección de propagación del haz (figura 2), por tanto cuanto más homogéneo sea el índice de refracción de los diferentes materiales (condensador, portaobjetos, medio de montaje, cubreobjetos, espacio de trabajo y lente objetivo) que tiene que atravesar un haz luminoso hasta llegar a nuestros ojos, o al material

impresionable, mejor será la imagen obtenida.

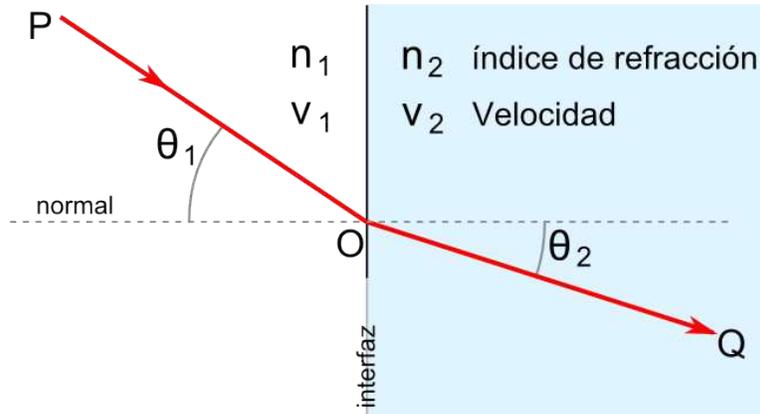


Figura 2. Refracción de la luz: representación gráfica del cambio de trayectoria de un haz luminoso cuando atraviesa dos elementos con distinto índice de refracción

- **Poder de Resolución:** el poder de resolución, o la resolución óptica, es la capacidad que tiene un objeto de permitir diferenciar dos puntos muy próximos como imágenes separadas (figura 3). El poder de resolución viene definido por la longitud de onda de la fuente de luz ( $\lambda$ ) y la apertura numérica del objetivo ( $AN$ ), mediante la siguiente fórmula:

$$\delta = \frac{\lambda}{2 * A_N}$$

La apertura numérica es un parámetro adimensional que es muy próximo al índice de refracción del material que está hecha la lente, pero que está matizado por el ángulo de aceptación máximo del haz de luz que puede entrar o salir de ésta:  $AN = n \sin \theta$ . En el caso de un microscopio óptico convencional el poder de resolución máximo es de  $1 \mu\text{m}$  (figura 3)

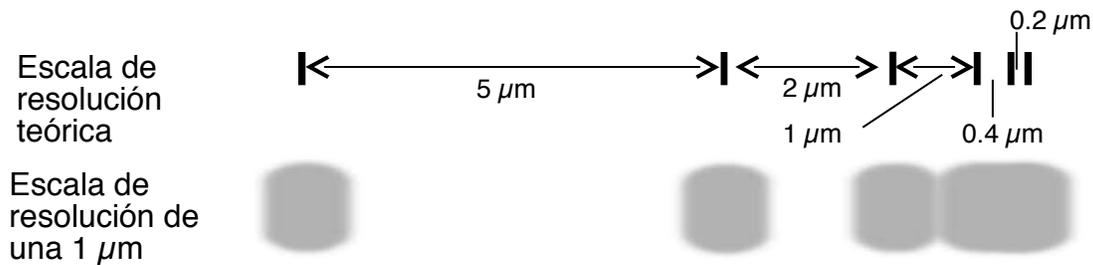


Figura 3. Esquema del poder de resolución del microscopio óptico

## Tipos de Microscopía Óptica

El uso de determinados elementos colocados en el condensador y/o los objetivos (raramente en los oculares), que se interponen al haz luminoso filtrándolo u obstaculizándolo da lugar a los distintos tipos de microscopía óptica. Este tipo de dispositivos manipulan físicamente el haz luminoso seleccionando parte de las ondas de las que se compone dicho haz, lo que provoca una imagen contrastada de la muestra sin necesidad de teñirla. Podemos definir los siguientes tipos de microscopía (más usuales)

- **Campo claro:** No se interpone ningún elemento más allá de un filtro de luz de día (color azul), que simplemente modifica la temperatura de color de la iluminación proveniente de una lámpara convencional haciéndola más fría, más azulada, y de esa manera es más natural y menos molesta a la vista (lámina 1A).
- **Campo oscuro:** Se interpone un dispositivo opaco entre el haz de luz y la muestra que solo permite pasar los rayos periféricos y el objetivo solo recibe aquellos rayos dispersados por la muestra, mientras el resto se pierde. De esta manera observamos unos límites muy definidos sobre un fondo oscuro. Es muy útil para muestras que no se pueden teñir y preparaciones en vivo (lámina 1B).
- **Contraste de Fases:** Las estructuras internas de las muestras (como por ejemplo las células) tienen diferentes índices de refracción, al igual que el medio que les rodea, y este tipo de microscopía intenta potenciar este fenómeno físico (recordar que la onda al refractarse pierde velocidad, provocando un desfase). Para poder llevar a cabo tipo de microscopía es necesario seleccionar también una parte del haz de luz, que afecta tanto al haz antes de atravesar la muestra como a los rayos que la han atravesado. Por esta razón, se utiliza un condensador y un objetivo especiales llamados de fase, y cada objetivo de aumento ha de estar compaginado con el del condensador. El resultado es un fondo grisáceo donde la muestra queda muy contrastado y el interior con diferentes grados de gris. También es útil para muestras que no se pueden teñir, que se han de estudiar en vivo, o que tienen numerosas ornamentaciones, como pelos, escamas, etc (lámina 1C)

- Contraste de interferencia (Nomarski y polarización):** es una técnica de microscopía de luz que emplea filtros polarizadores y prismas que producen imágenes con tridimensionalidad, aunque el relieve obtenido no es real. El paso de la luz a través de los prismas produce birrefringencia, que es el fenómeno físico que explota esta técnica. La polarización de la luz produce una mayor acutancia de la imagen en los bordes de la muestra. Este tipo de microscopía se caracteriza por su buena resolución y contraste que ayudan a discernir tanto detalles superficiales como estructuras internas. Además, el uso de prismas permite obtener imágenes de colores brillantes sin necesidad de aplicar protocolos de tinción, ni de preparación de muestras (lámina 1D).

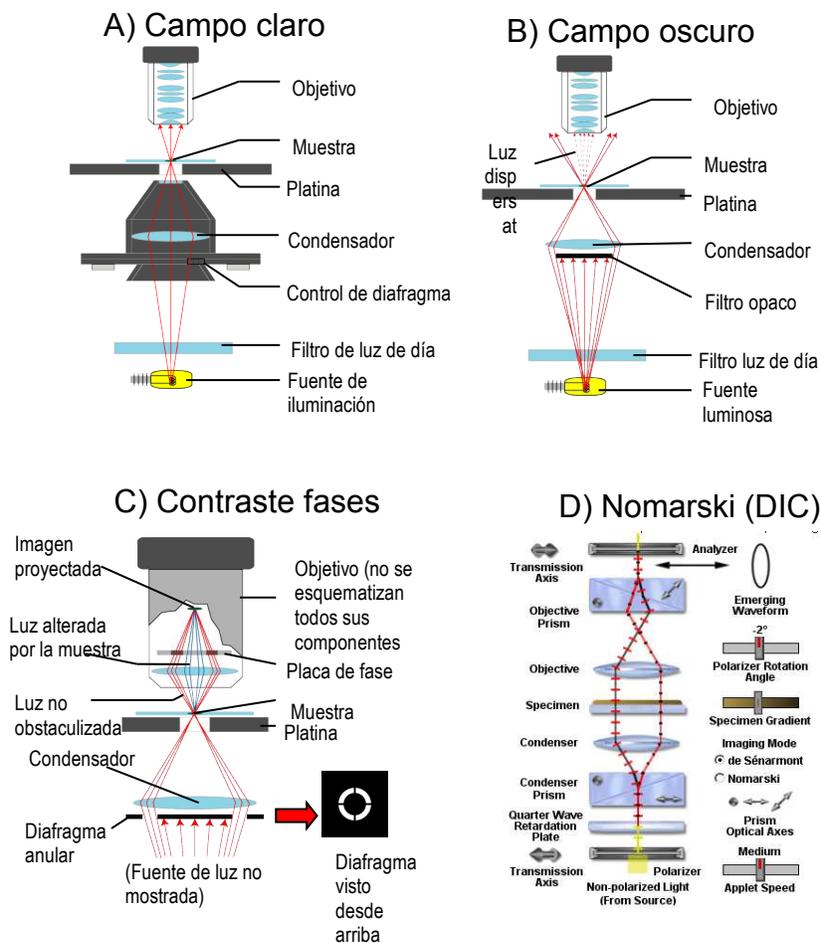


Lámina 1: Organización interna y paso del haz luminoso en los distintos tipos de microscopía óptica

- **Epifluorescencia:** la fluorescencia es la capacidad que tienen algunas sustancias de emitir luz en una longitud de onda determinada, bien de forma espontánea (natural) o bien provocada, cuando se excita mediante una onda electromagnética de longitud de onda característica. El microscopio de fluorescencia aprovecha esta propiedad de las sustancias al poder manejar mediante filtros la longitud de onda que incide y que emite una muestra determinada. Actualmente, el microscopio de fluorescencia más utilizado es el de epifluorescencia, que simplemente indica que la luz filtrada no atraviesa la muestra sino que incide sobre ella a través de la lente objetivo, y esta misma lente es la encargada de recoger la luz que emite la muestra excitada. Generalmente, en microscopía de fluorescencia la muestra es tratada con marcadores fluorescentes, basados en fluorocromos (sustancias capaces de emitir luz en una longitud de onda determinada), de tal forma que se puede controlar el tipo de fluorescencia que se quiere observar y relacionarla con la estructura marcada.

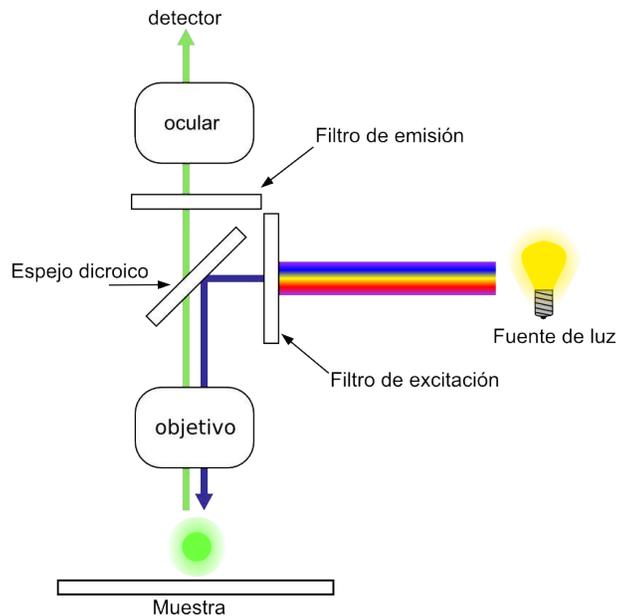


Figura 4: Esquema de la organización interna de un microscopio de fluorescencia y movimiento y filtrado del haz luminoso.

## Fuentes de información

1. Locquin, M. y Langeron, M. *Manual de Microscopía*. Editorial Labor, S.A., Barcelona, 1985.
2. <http://www.microscopyu.com>
3. <http://modernmicroscopy.com/>
4. <http://www.bioedonline.org/>
5. <http://microscope.fsu.edu>

## Créditos de las figuras

1. El logo del encabezamiento proceden de la página web <http://ocw.um.es/>
2. La figura 1 ha sido obtenida de la página web de Kalipedia: [http://www.kalipedia.com/fisica-quimica/tema/ondas/microscopio.html?x=20070924klpcnafyq\\_377.Kes&ap=1](http://www.kalipedia.com/fisica-quimica/tema/ondas/microscopio.html?x=20070924klpcnafyq_377.Kes&ap=1).
3. Las figuras 2 y 3 han sido obtenidas y adaptadas de la presentación de D.R. Caprette, “*Light microscopy: Instrumentation and Principles*”, BioEd Online. La presentación se ha obtenido de la página web de BioEd Online: <http://www.bioedonline.org/>.
4. Las figura A, B y C de la lámina 1 han sido obtenidas y adaptadas de la presentación de D.R. Caprette, “*Light Microscopy: Comparison of Optics*”, BioEd Online. La presentación se ha obtenido de la página web de BioEd Online: <http://www.bioedonline.org/>.
5. La figura D de la lámina 1 ha sido obtenida de la página web de Nikon MicrocopyU: <http://www.microscopyu.com/tutorials/java/dic/wavefrontcomparison/index.html>.
6. La figura 4 es de H. Mühlpfordt y ha sido obtenida de la página Wikimedia Commons: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters\\_2008-09-28.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters_2008-09-28.svg).