

Sesión 2:

*Fundamentos de Microscopía Óptica*

Nicolás Ubero Pascal





## Nota informativa del autor de la presentación

Las imágenes, ilustraciones y/o esquemas que aparecen en esta presentación pueden no ser completamente de la propiedad del autor, por tanto la autoría de éstas, así como su procedencia, se pueden consultar al final de la presentación bajo el título:

### Créditos de las Ilustraciones

## Copyright informative note of presentation

Pictures (photography, illustrations and/or graphics) appearing in this presentation could not be at all copyrighted by the author, therefore at the end of the presentation all the pictures will be related to their authorship and the pathway of the web site where they have been taken.

The title of that slide is:

### Pictures Copyright



Compound Microscope, circa 1751

# Microscopía óptica: instrumentación y principios

Autor:

David R. Caprette,  
Ph.D.

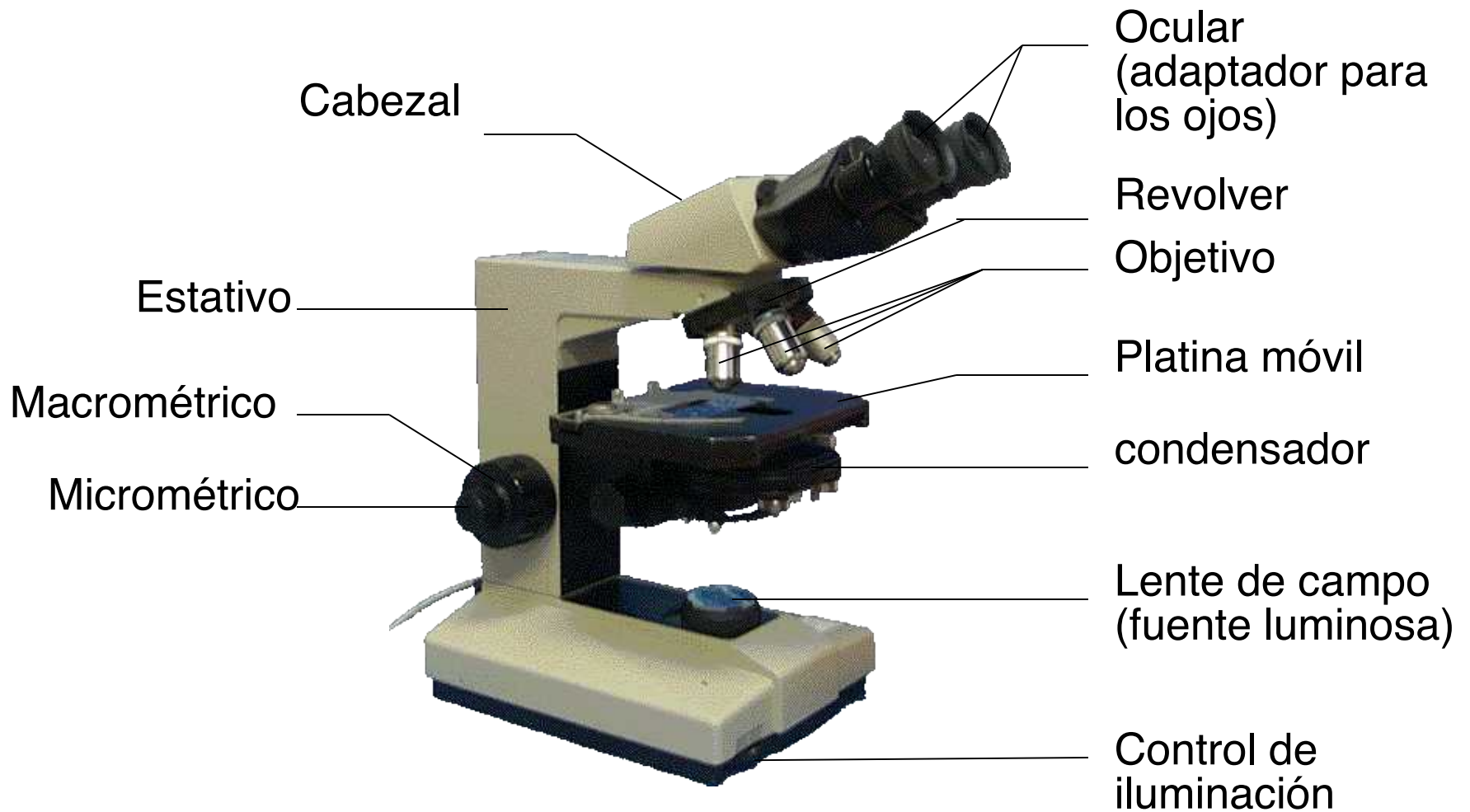
Adaptación:

Nicolás Ubero



# Microscopio óptico compuesto

---



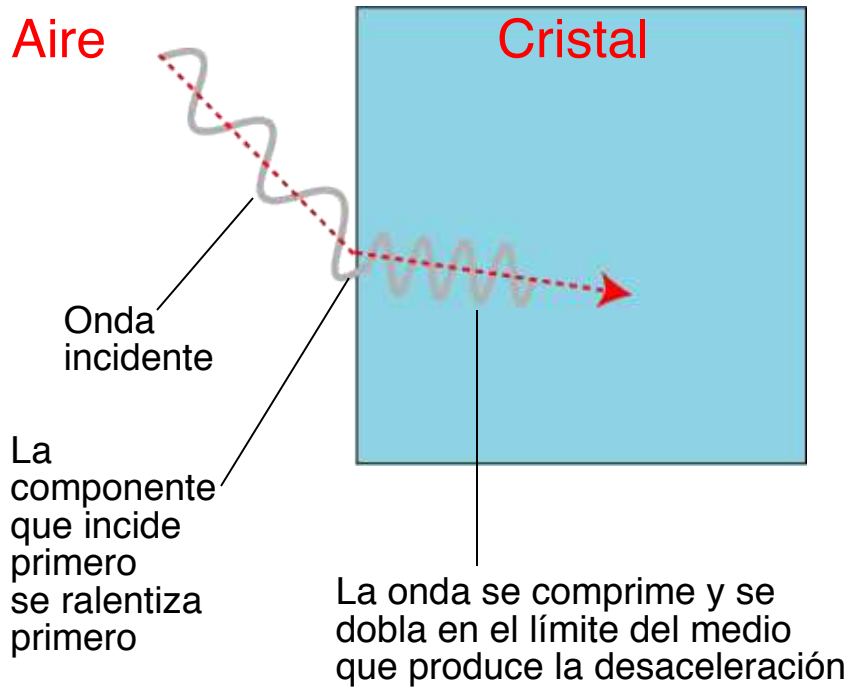


# Fundamentos técnicos de la microscopía óptica

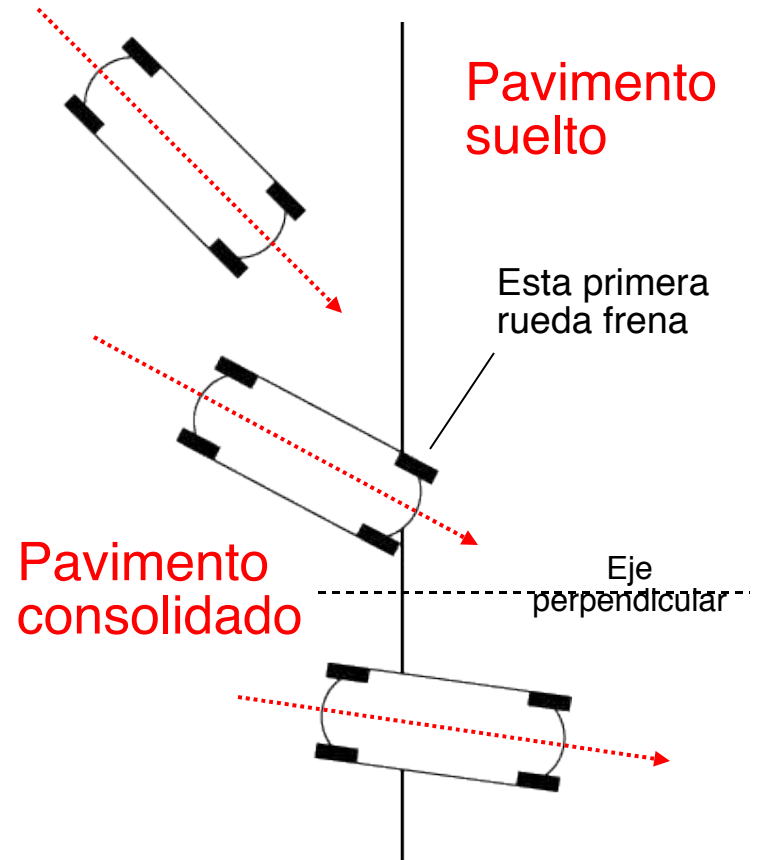


# Refracción

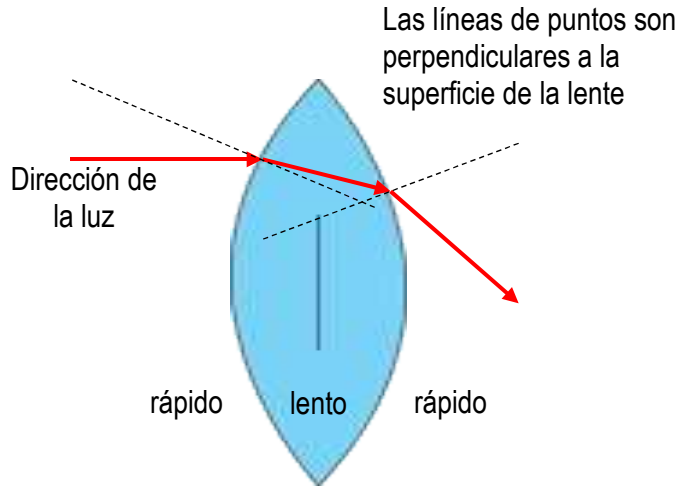
La luz se dobla en ángulo cuando incide en una superficie



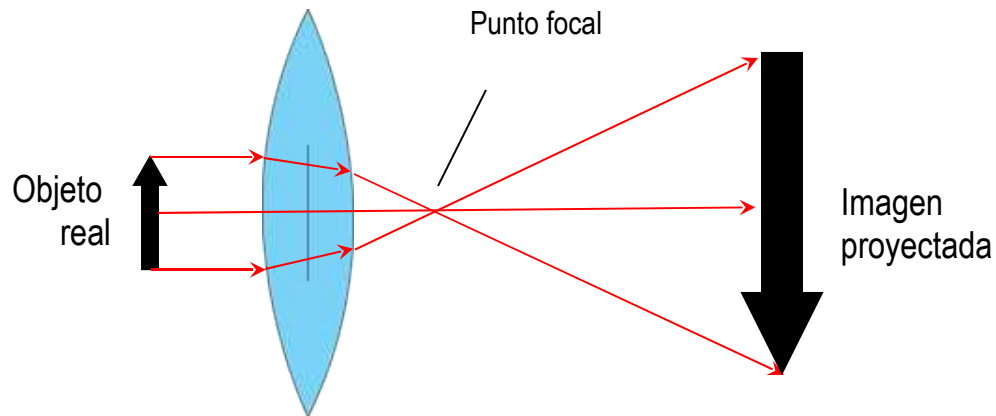
Al igual que un vehículo cambia su dirección cuando entra en un terreno de gravilla



# Aumentos y Orientación I



Una lente biconvexa curva la luz en la misma dirección cuando entra y cuando sale



Posición actual

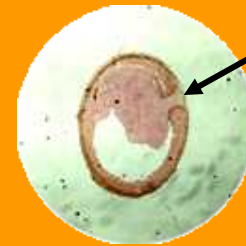


Imagen aparente



Frog gastrula, saggital section; arrow indicates yolk plug

Dirección del movimiento



Dirección aparente

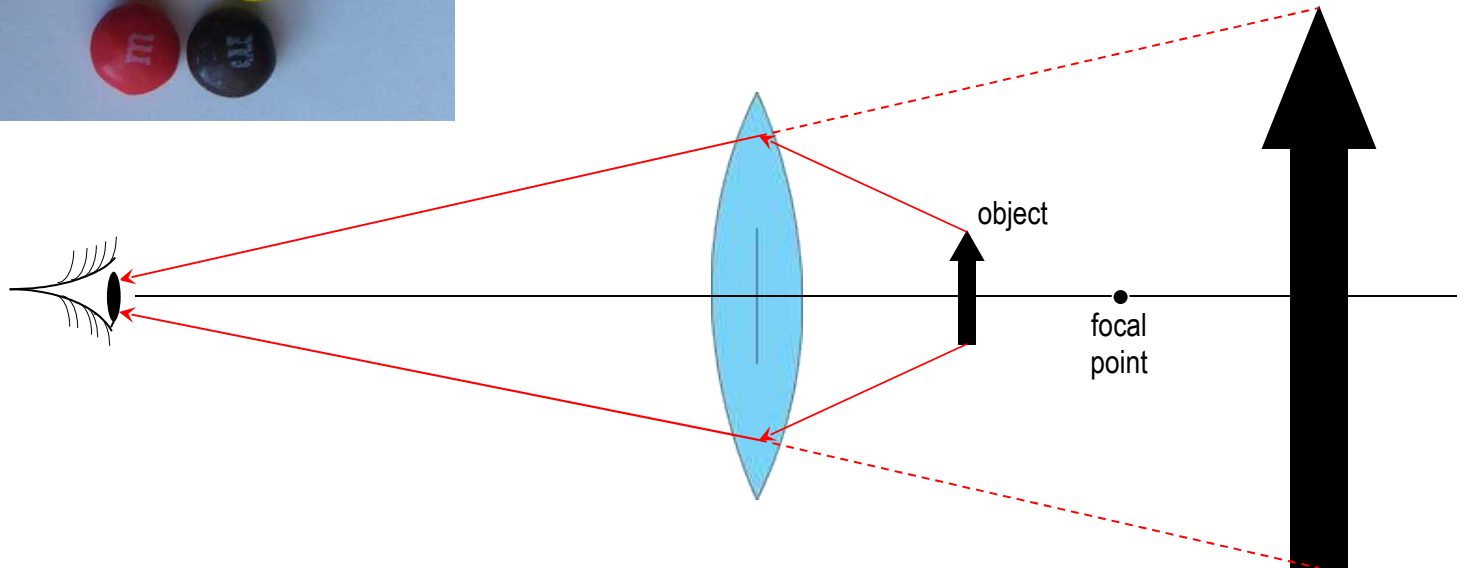


# Aumentos y Orientación II



¿Por qué una lente de aumento simple no produce una imagen invertida?

Con el objeto más cerca de la lente que del punto focal, los rayos de luz divergen dando al observador la ilusión de que está viendo un objeto más grande, más alejado, pero en la misma orientación..

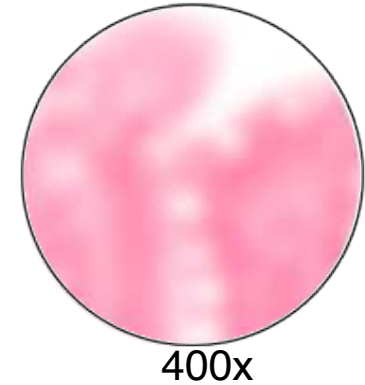
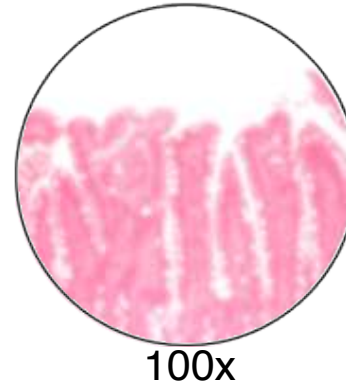
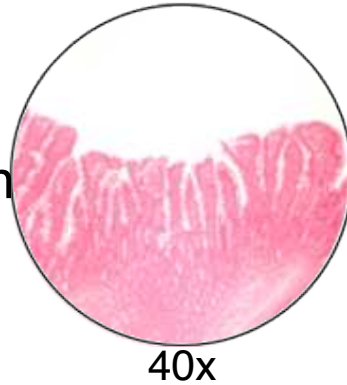




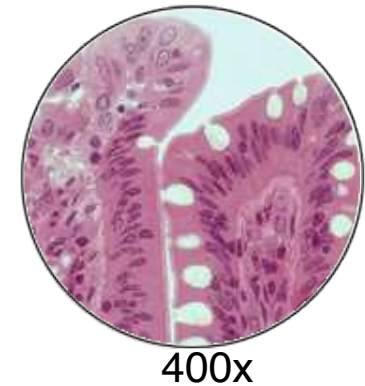
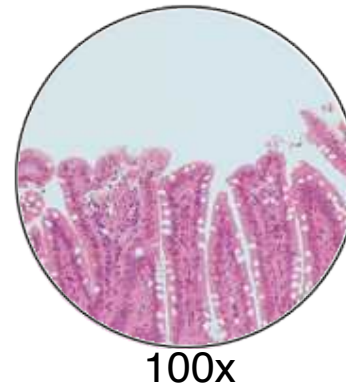
# Aumentos

---

Aumentos finales usando una lente simple (por ejemplo un estereomicroscopio)



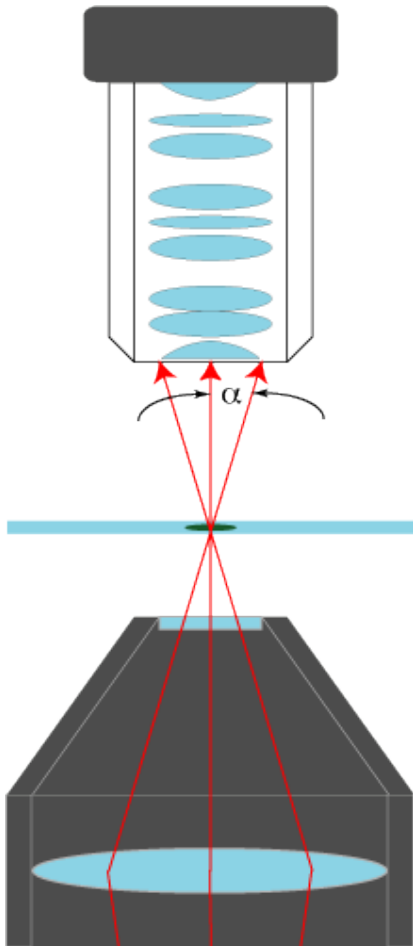
La misma imagen: usando un microscopio óptico compuesto



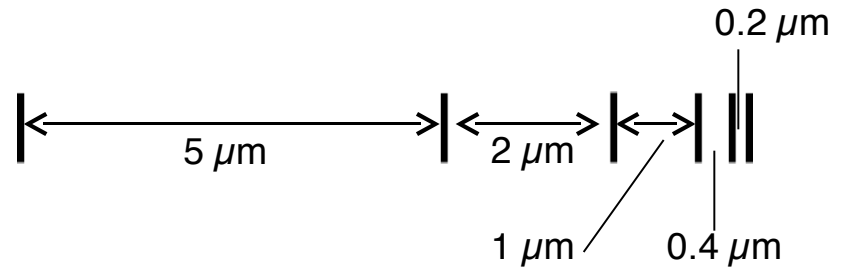
# Resolución

$$\text{Resolución (d)} = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha}$$

$\lambda$  = Longitud de onda de la luz;  $n$  = índice de refracción



Escala de resolución teórica

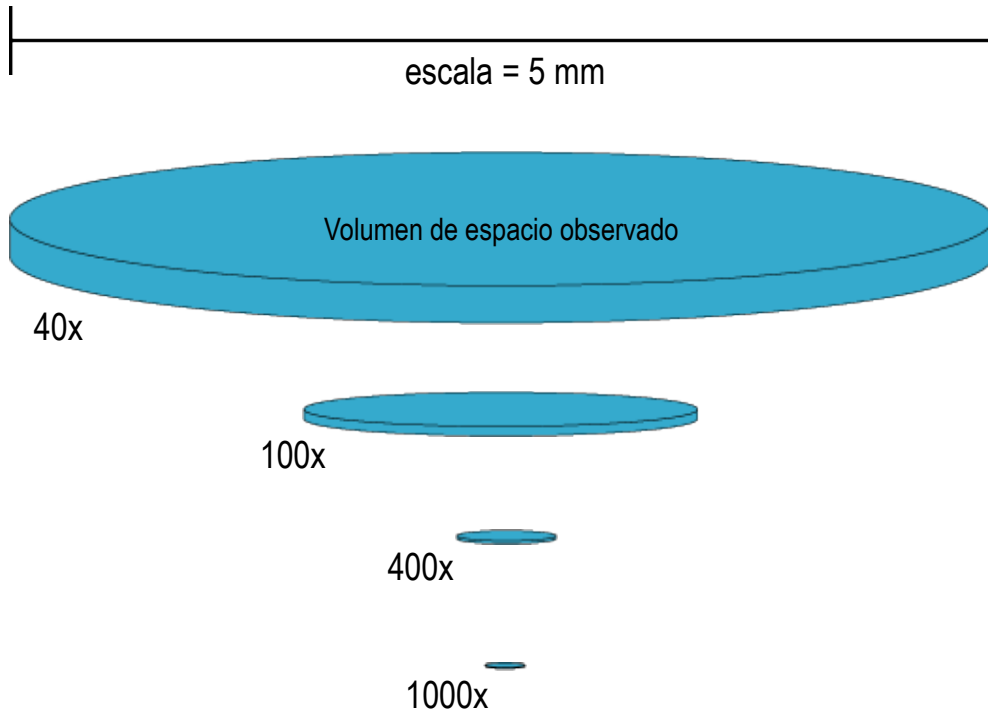


Escala de resolución de una  $1 \mu\text{m}$

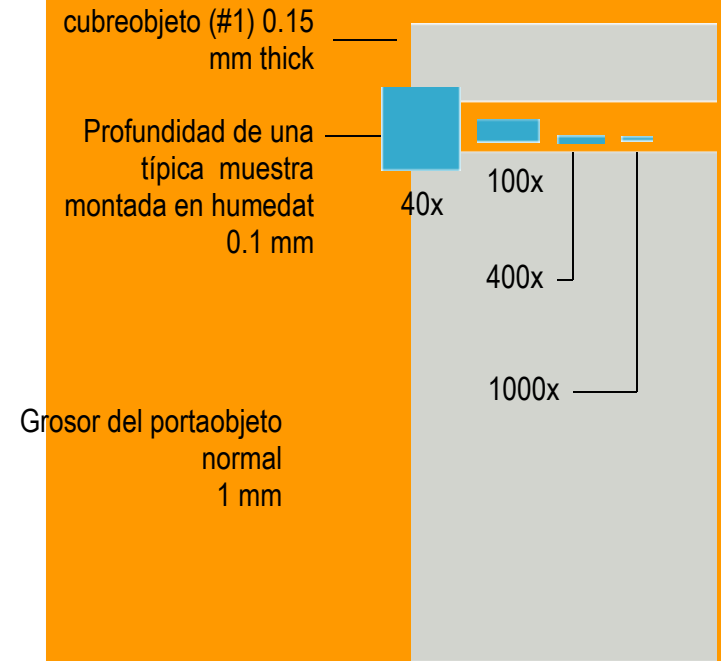


# Campo visual y profundidad de campo

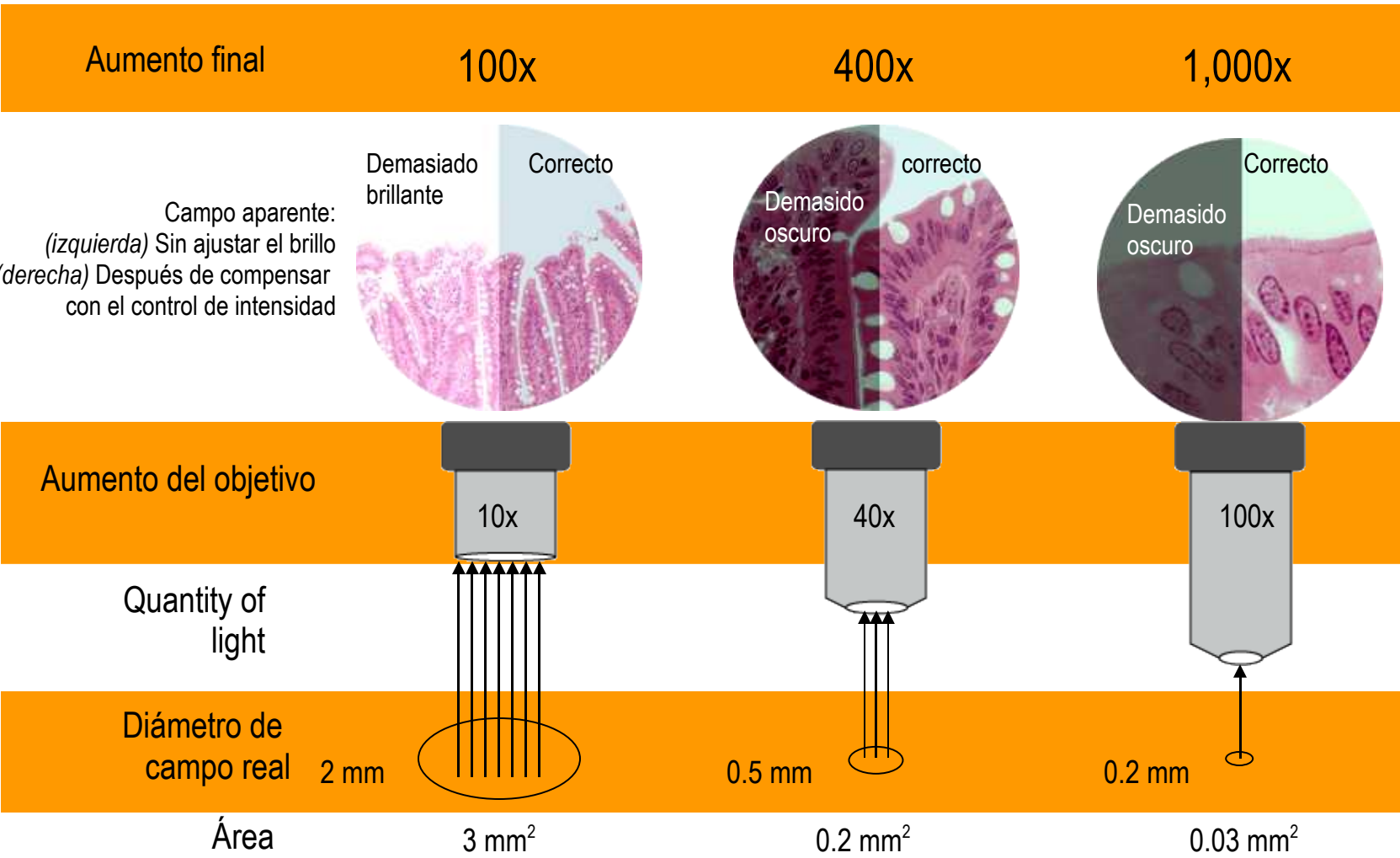
Volumen tridimensional  
Teniendo en cuenta los cambios del aumento



Profundidad de campo  
a diferentes aumentos



# Campo visual e intensidad de la luz



# El contraste y el condensador

Vista superior de un condensador con selector de filtros



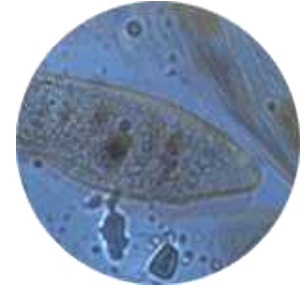
Vista lateral del condensador



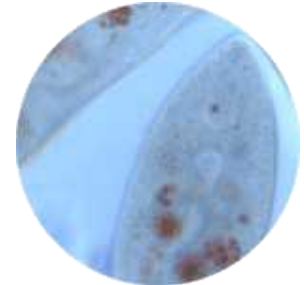
Apertura del condensador: tres posiciones



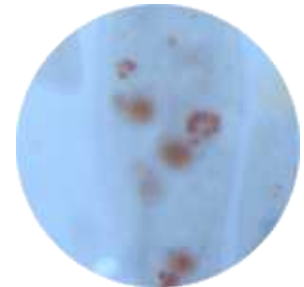
Totalmente cerrado



Resolución y contraste optimizados

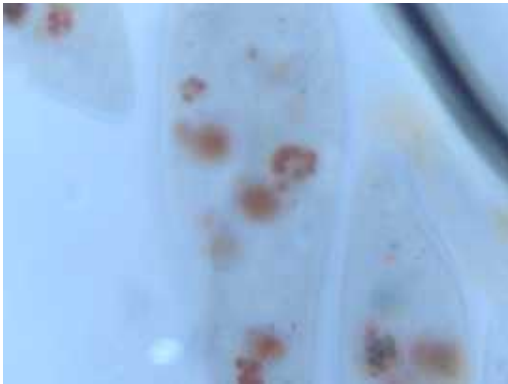


Totalmente abierto

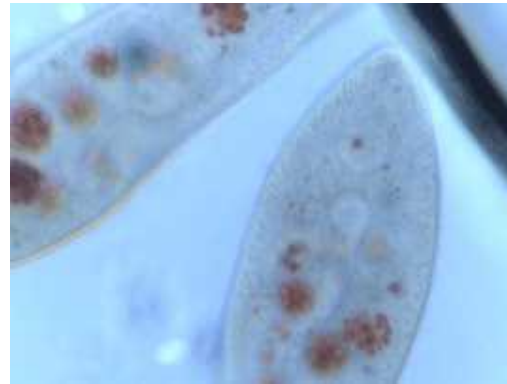


# Contraste y variación en el condensador

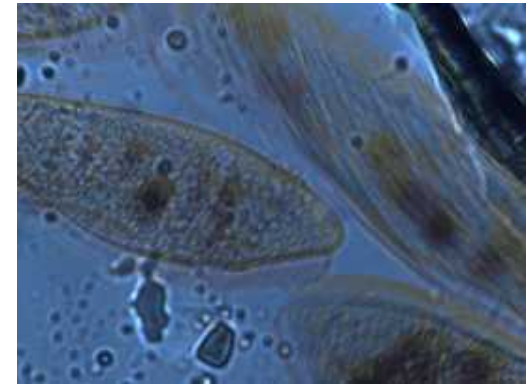
Tres imágenes de *Paramecium caudatum* (vacuolas alimentarias con células de levadura)



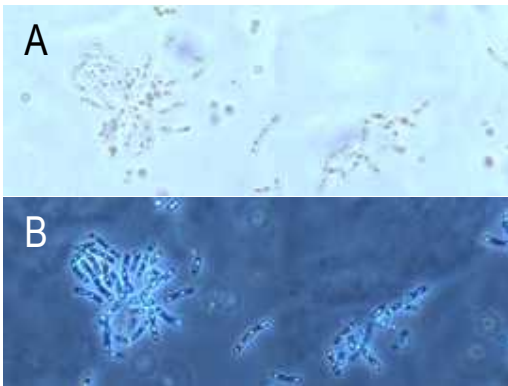
Contraste bajo



Contraste óptimo



Alto contraste



A

B

(Izquierda) *Bacillus thuringiensis* con endosporas: (A) campo claro; (B) Contraste de fases (400x)

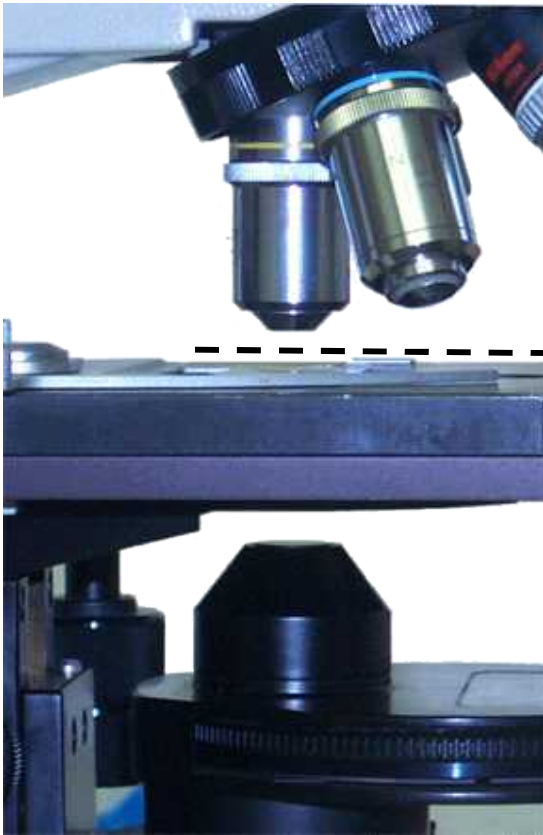
(derecha) Pseudopodo de *Chaos (Pelomyxa) carolinensis*: (C) campo claro; (D) campo oscuro (100x)

C

D



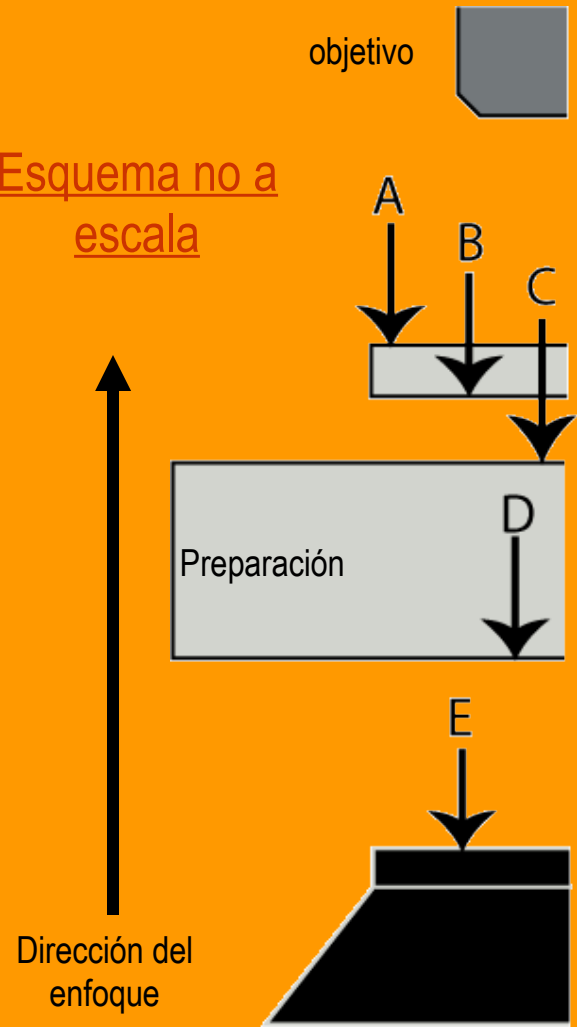
# Enfocando multiples superficies



Foco inicial por encima de la preparación

Condensador abierto para una mayor claridad

Esquema no a escala



# Observando a través del espécimen

Enfocando a través de un filamento de *Spirogyra* (400x)



Células superiores enfocadas

Siguiente paso



Cloroplastos enfocados justo debajo de la pared celular

Siguiente paso



Aproximadamente a la mitad de la célula

Siguiente paso



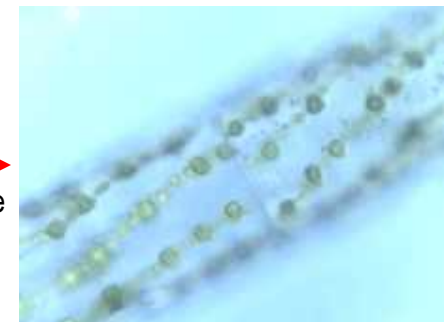
Enfoque en el centro de la célula

Siguiente paso



Alcanzando el fondo

Siguiente paso



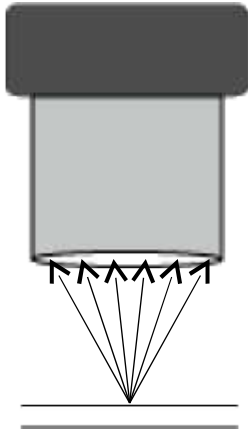
Cloroplastos enfocados justo encima de la pared celular





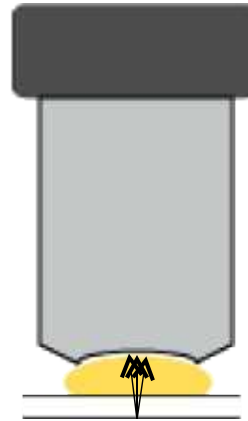
# Microscopía con aceite de inmersión

Aumentos en seco

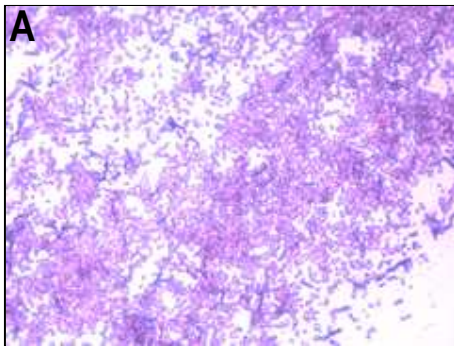


Difracción severa que compromete una buena resolución

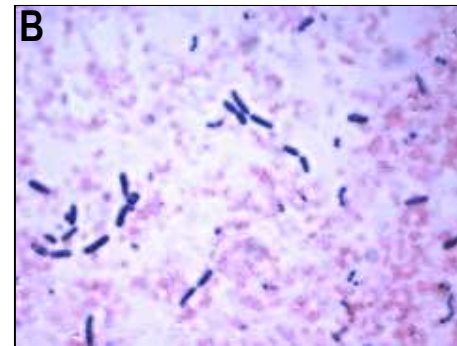
Aceite de inmersión



La difracción es minimizada con el uso de aceite de inmersión



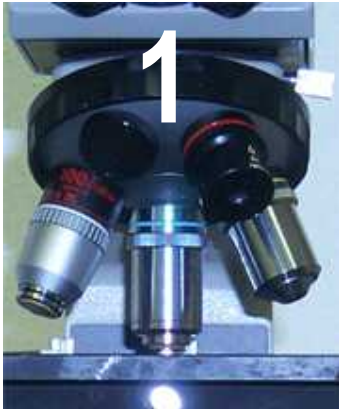
A: Bacteria at 400x Aumentos en seco mostrando una imagen borrosa (Resolución pobre)



B: Bacteria at 1000x Con un objetivo de inmersión (Porción central del campo de visión de A)



# Uso del objetivo de inmersión



1  
Enfocar en seco con el objetivo de mayor aumento.



2  
Mover el revólver y dejarlo en una posición entre dos objetivos



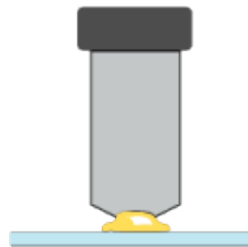
3  
Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el espécimen



4  
Colocar cuidadosamente el objetivo de inmersión sobre el espécimen



5  
Y ya se puede observar



La punta del objetivo debe estar completamente embebida en el aceite.

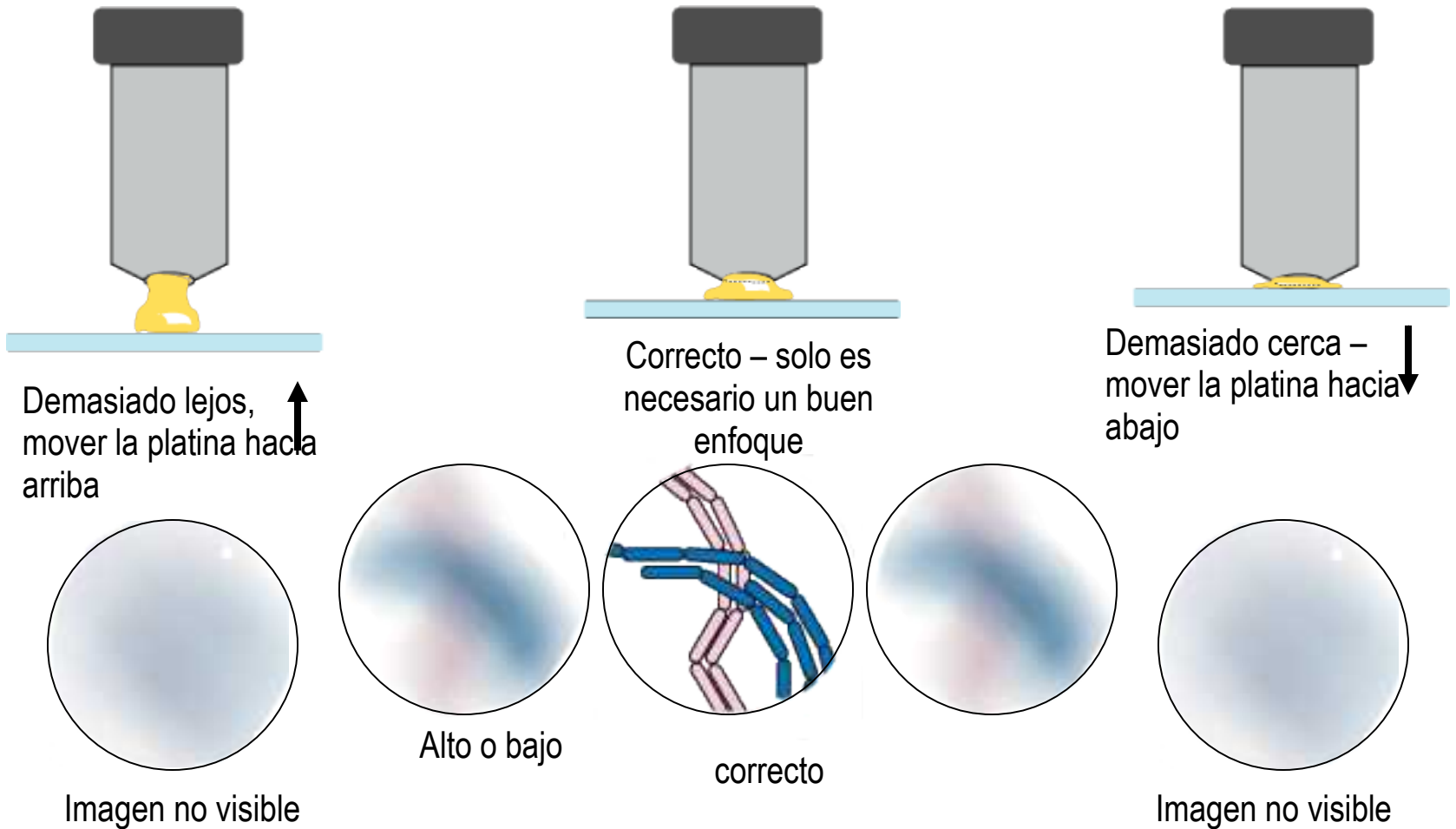
Disposición de aceite sobre el cubreobjetos



Colocación de aceite sobre un frotis (sin cubreobjetos)

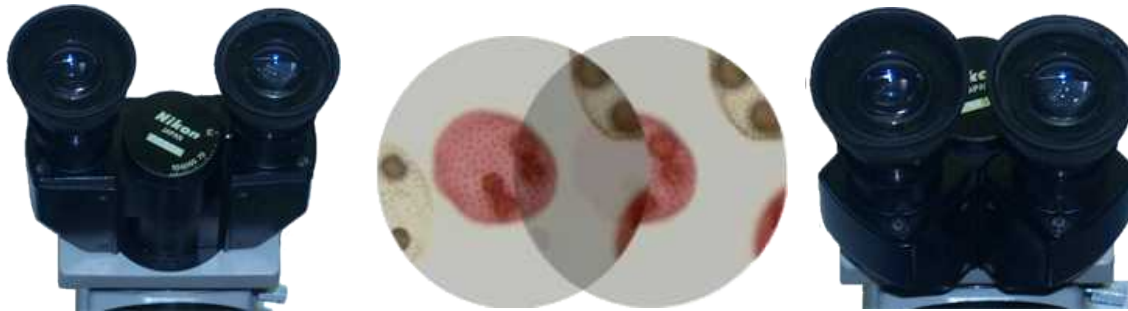


# Enfoque con un objetivo de inmersión



# Ajuste de los oculares

## Separación de los ojos



Totalmente  
abierto

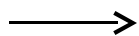
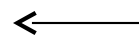


Imagen doble



Totalmente  
cerrado



Ajustar para una sola imagen

## Enfoque del ocular (girar para enfocar)



centro

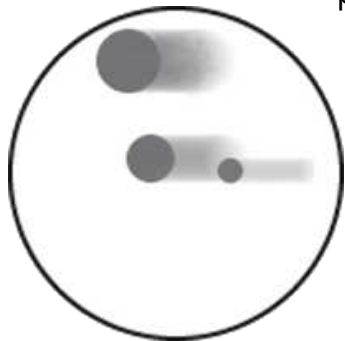
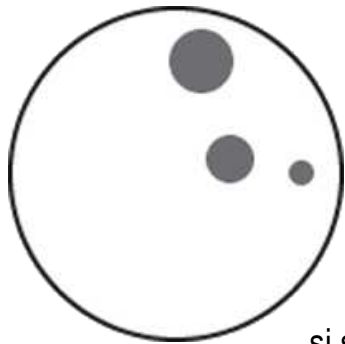


Girar para extender el  
tubo del ocular



# Lentes sucias?

Si ve marcas contra un campo vacío, mueva la muestra de izquierda a derecha



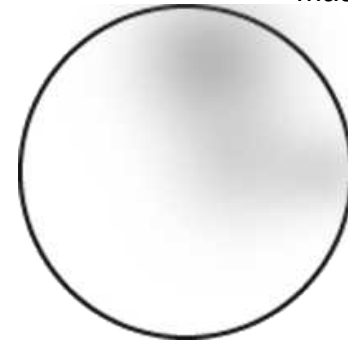
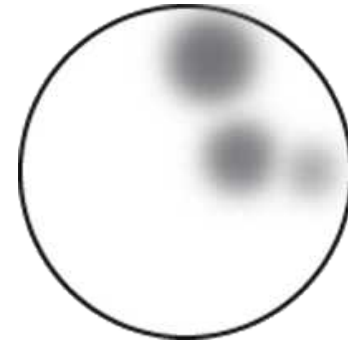
... si se mueven, las manchas están en la preparación

Si las marcas no están en la preparación, girar el ocular



... si se mueven indica que las marcas están en el ocular

Manchas fuera de foco pueden aparecer en el condensador. Para saberlo



...si alejamos el condensador estas estarán mas fuera de foco



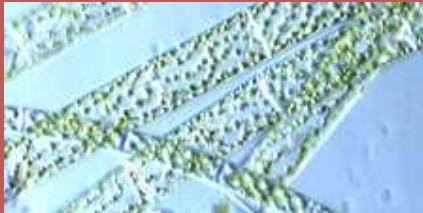
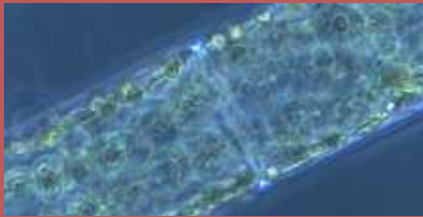
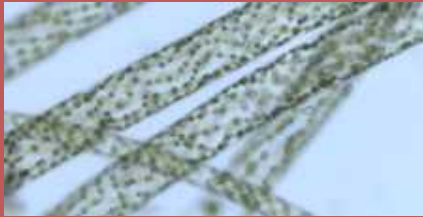
# Comparación de los distintos tipos de microscopía óptica

Autor:

David R. Caprette,  
Ph.D.

Adaptación:

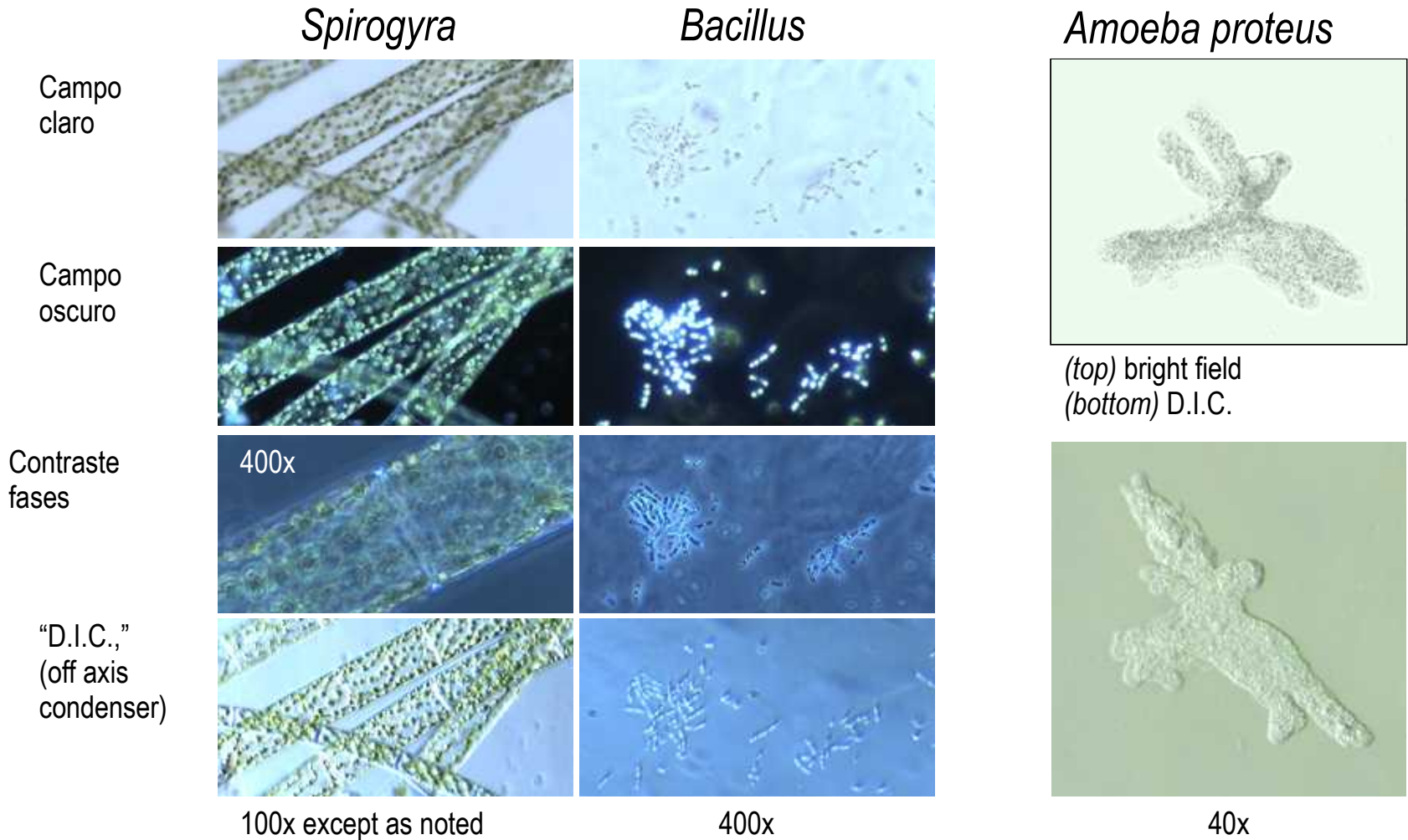
Nicolás Ubero



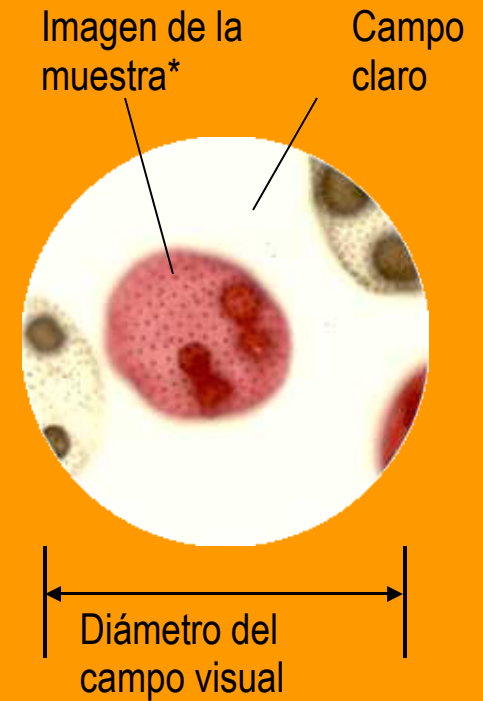
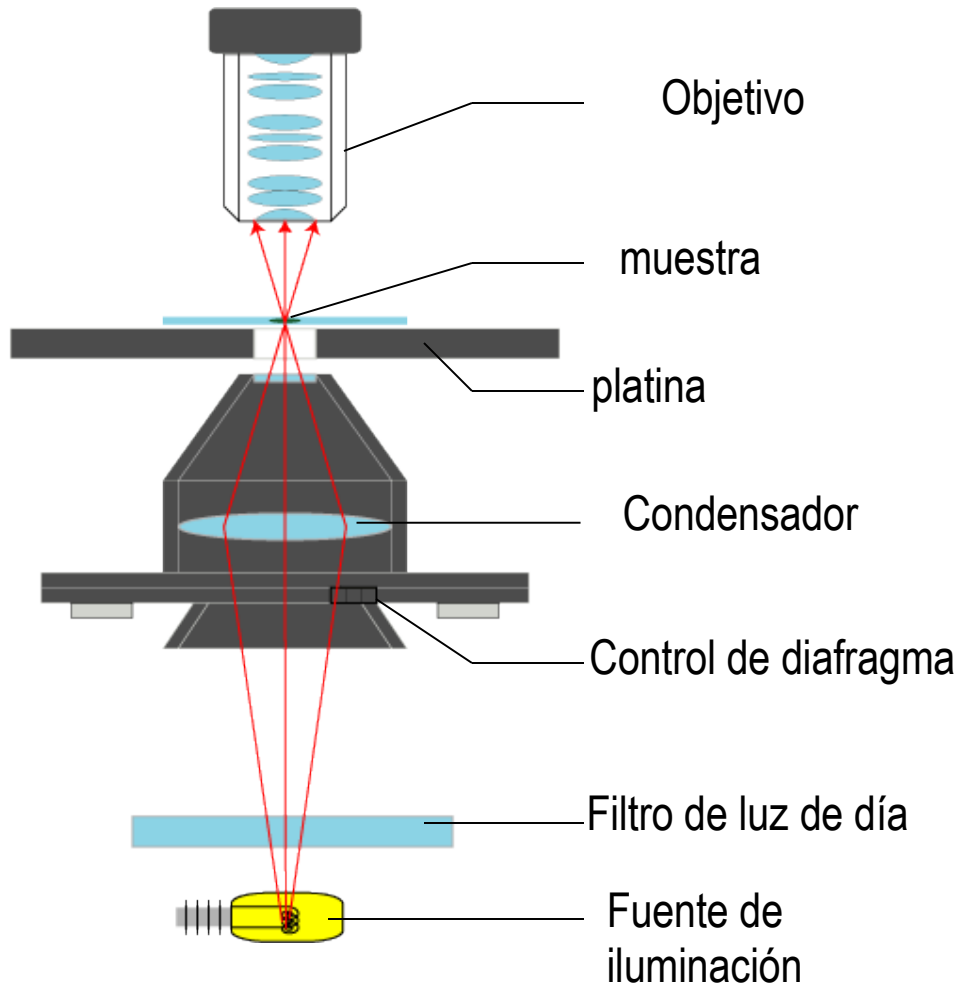
Dave Caprette



# Comparación de los tipos de microscopía óptica



# Microscopía de campo claro

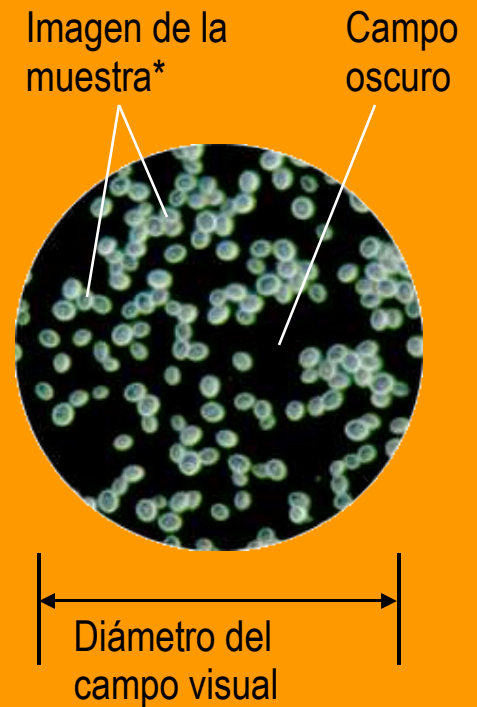
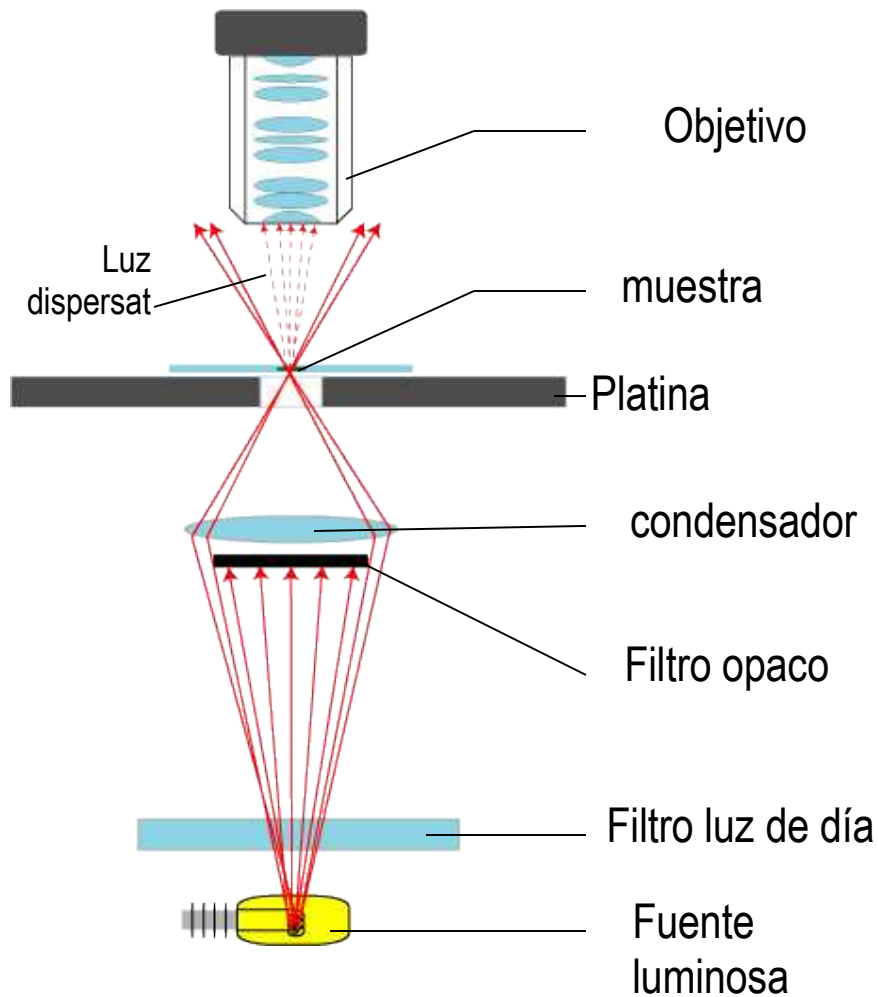


\*Volvox (fixed and stained)





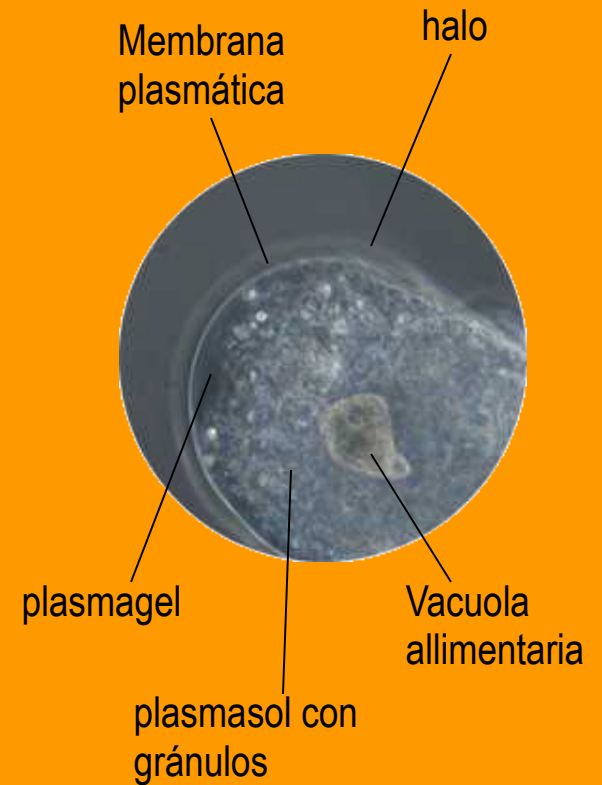
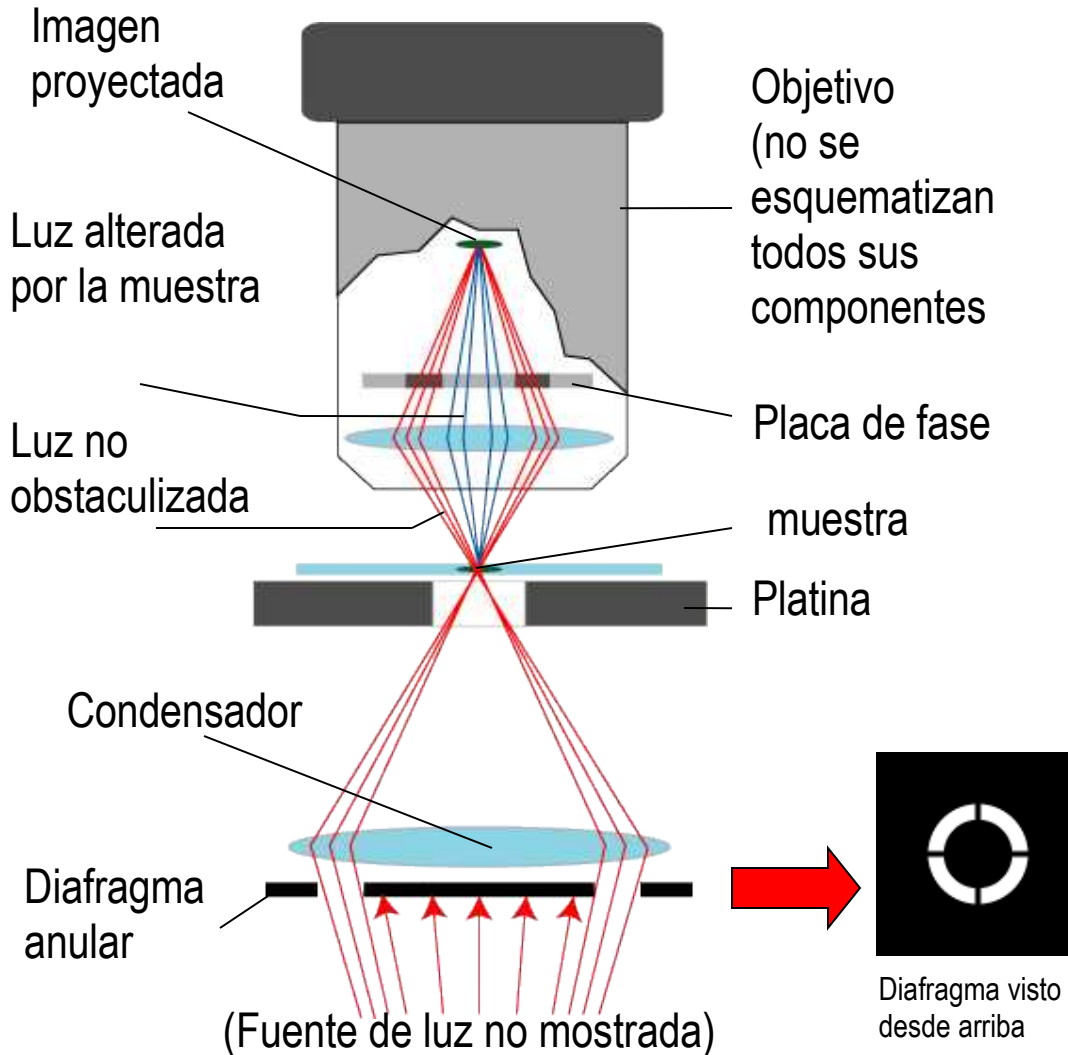
# Microscopía de campo oscuro



\*yeast cells in suspension



# Microscopía de contraste de fase



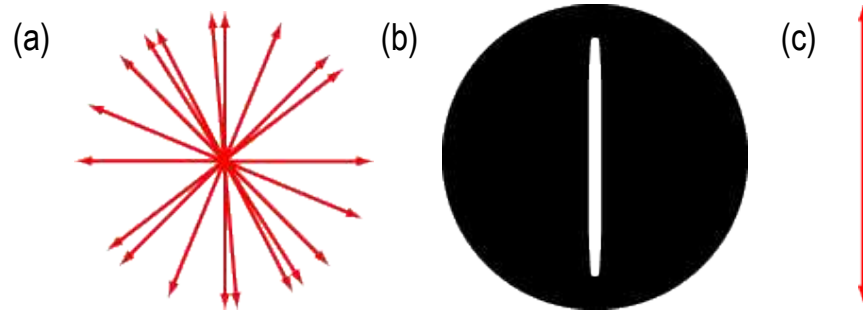
Muestra: *Chaos (pelomyxa) carolinensis* pseudopodium, 400x



# Microscopía Contraste Interdiferencial (Nomarski)

## Polarized light

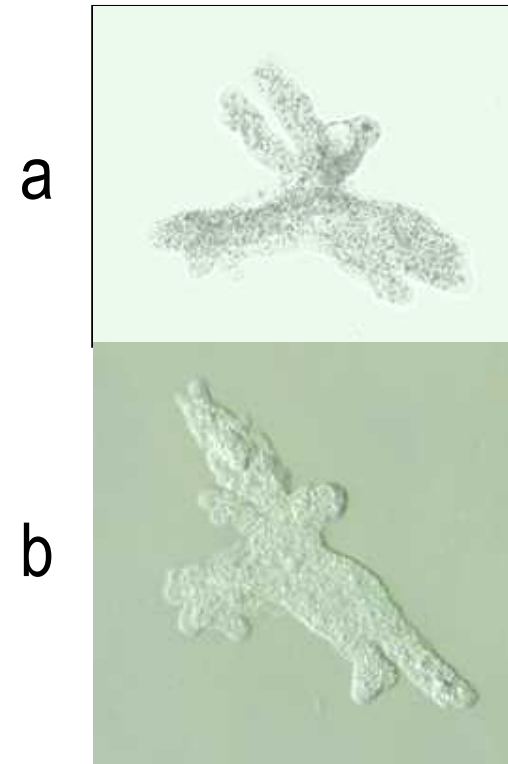
Dirección de la vibración (luz que llega al observador)



(a) luz blanca (no polarizada)

(b) Filtro polarizador

(c) Luz polarizada



*Amoeba proteus* (100x):

(a) imagen de campo claro; (b) D.I.C. Efecto obtenido al ajustar el condensador





## Otros ejemplos: Huevo de insecto con campo claro



© N. Ubero-Pascal

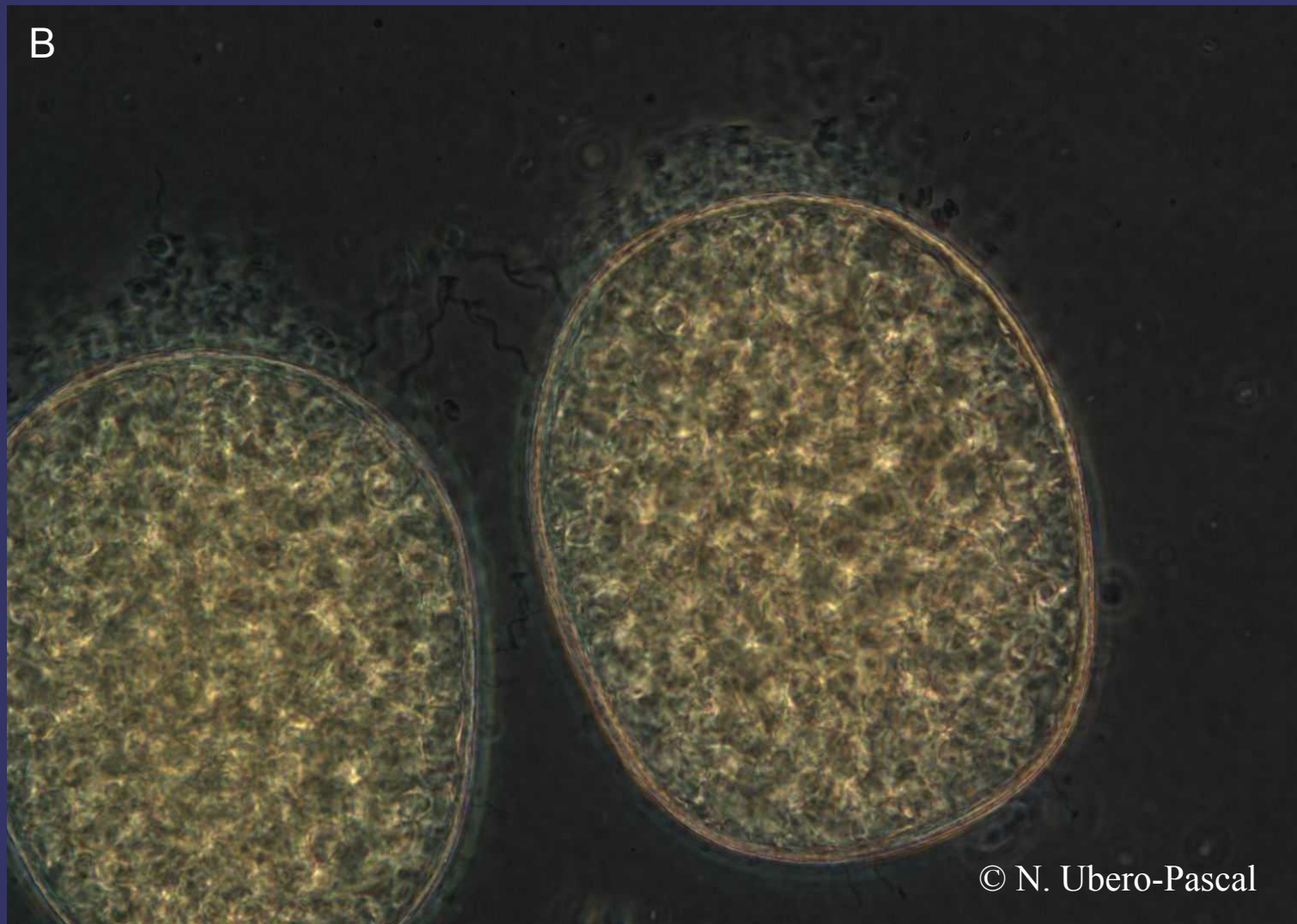


## Huevo de insecto con campo oscuro



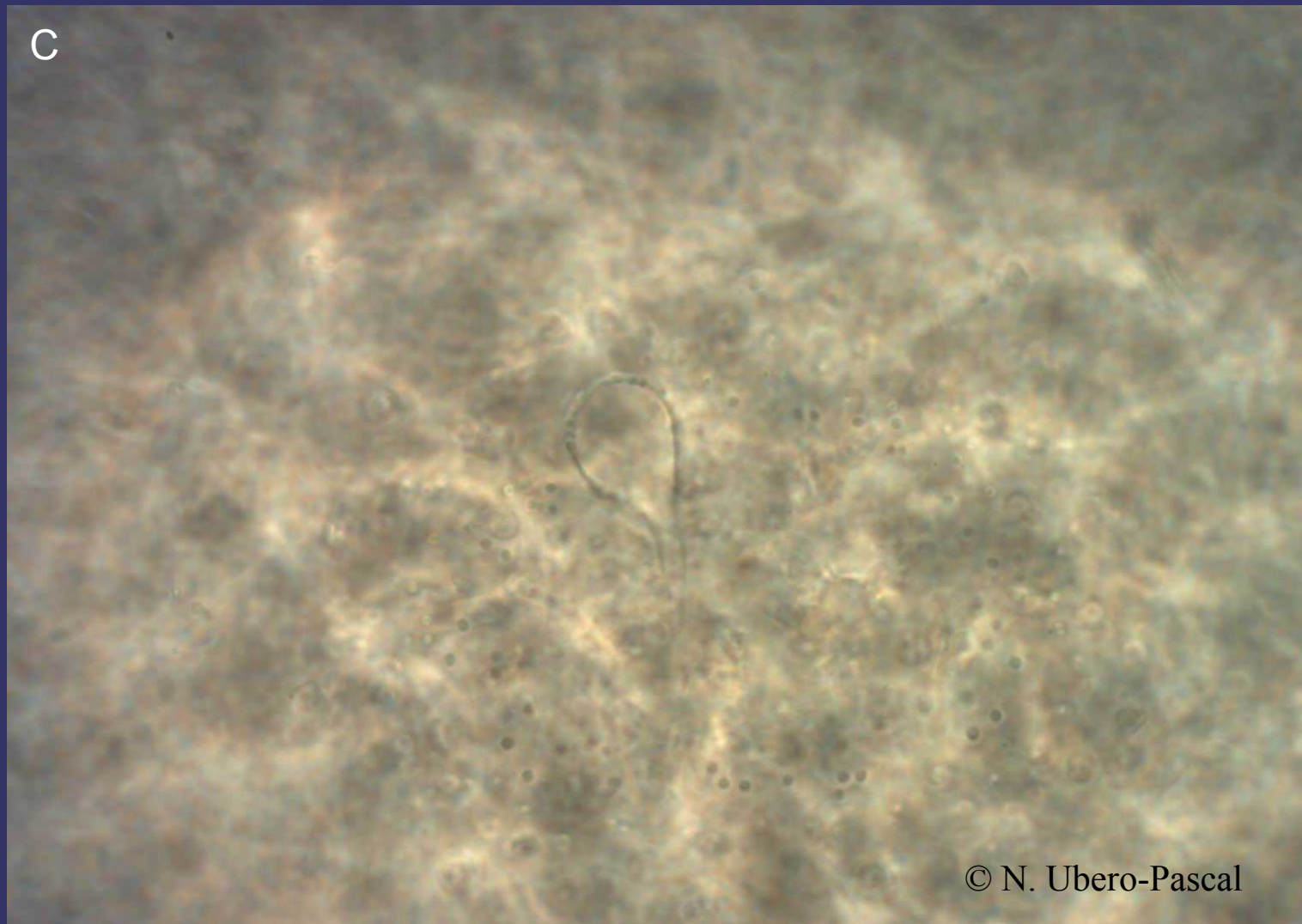


Huevo de insecto con contraste de fases





Detalle de un huevo de insecto con contraste de fases





Huevo de insecto con contraste interdiferencial (DIC) Nomarski







## Créditos de las Ilustraciones / Pictures copyright

- Logo Portada OCW-UM. Autor: Universidad de Murcia: Dirección web: <http://ocw.um.es/>
- Logo encabezamiento. Autor: Musarumana: Dirección web: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscopio\\_gif.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscopio_gif.jpg)
- Diapositivas 3-4 y 6-27 adaptadas de las presentaciones de D.R. Caprette: “Light Microscopy: Instrumentation and Principles” y “Light Microscopy: comparison of optics”, publicadas on line en BioEd Online. Disponible en la página web: <http://www.bioedonline.org/presentations/index.cfm#presentation32>
- Las figuras A, B, C y D de las páginas 29 a32 son de Nicolás Ubero