

2 - El Microscopio

El desarrollo del microscopio en los últimos tres siglos, ha permitido ampliar el campo de la investigación biológica, y se ha convertido en el instrumento básico para abrir nuevas fronteras en Biología.

Se denomina microscopio (de micro = pequeño y skopein = mirar) al instrumento óptico que amplía el tamaño de las estructuras que por su pequeñez no son visibles a simple vista.

El ojo es nuestro sistema óptico. Para ver con nitidez un objeto es necesario que la imagen se forme en retina. La distancia más cercana al ojo que puede dar una imagen nítida de un objeto se considera de 25 cm. aunque varía de una persona a otra. Igualmente pueden verse nítidamente objetos que se encuentran a más de 25 cm. ya que el ojo acomoda el cristalino, modificando su curvatura, por medio del músculo ciliar.

Partículas menores de 0.1 mm no son visibles por el hombre en condiciones normales de iluminación y distancia. Como muchos organismos vivos y la mayoría de las células tienen diámetros menores a 0.1 mm y se encuentran a distancias menores al límite de resolución del ojo humano, en Biología se hace indispensable el uso de instrumentos que aumentando el ángulo visual y el poder de resolución hagan posible la observación e individualización de los objetos.

De los instrumentos de óptica conocidos con el nombre de microscopio existen:

- a) **El microscopio simple** o lupa, compuesta por una sola lente o un solo sistema de lentes convergentes (da una imagen aumentada derecha virtual). Estos son poco usados en histología.
- b) **El microscopio compuesto**, formado por dos lentes básicas, el ocular o la pieza más próxima al ojo, aumenta la imagen producida por el objetivo que es la lente más próxima al objeto. Este es habitualmente usado o para el que se reserva el nombre de microscopio simplemente.

Microscopio compuesto:

Este microscopio consta de un estativo y una parte óptica.

- **Estativo:** está formado por el pie, el brazo o columna, la platina y el tubo, que contiene el ocular y el objetivo.
- **Parte óptica:** Está constituido por el aparato de iluminación (espejo, condensador y diafragma) situado debajo de la platina en el extremo inferior del brazo, y por el ocular y el objetivo.

Funciones de cada una de las partes:

Estativo: es la parte mecánica, mantiene el equilibrio del microscopio y sostiene la parte óptica.

Consta de:

- a) Pie: es la base donde se apoya el microscopio y mantiene el equilibrio.
- b) Columna: une la platina con la base y sostiene el condensador y el diafragma.
- c) Tubo: es el cilindro metálico que sostiene en sus extremos los sistemas de lentes que forman el objetivo y el ocular, manteniéndolos a distancia constante.
- d) Revolver: pieza giratoria adosada al tubo. Lleva los objetivos, permite colocarlos en posición de trabajo pasando rápidamente de uno a otro.
- e) Brazo: une el tubo con la platina.
- f) Platina: soporte plano con un orificio central que permite el paso del haz luminoso procedente del aparato de iluminación sobre el que se coloca la preparación a observar.
- g) Tornillo Macrométrico: (de avance rápido de cremallera). Permite que los objetivos se acerquen a distancia de trabajo lográndose un primer enfoque. Generalmente se encuentra en el brazo del microscopio. En algunos aparatos es el único tornillo de enfoque presente.
- h) Tornillo Micrométrico: (de ajuste fino). Permite enfocar con precisión (foco exacto claro). Igual que el macrométrico puede encontrarse en el brazo o columna, en algunos casos está incorporado en un mismo tornillo. Los dos tornillos pueden realizar sus movimientos desplazando en algunos casos el tubo y en otros la platina.
- i) Accesorios: puede haber un par de pinzas en la platina que ajustan la preparación, permitiendo su desplazamiento manual, o un mecanismo de desplazamiento antero posterior. También suele haber debajo del condensador un aro que actúa como soporte de filtros de luz para la corrección de aberraciones cromáticas.

Parte óptica:

1) Lentes:

- a) Objetivos: son las lentes o conjuntos de lentes que se hallan más cerca del objeto.

Puede haber uno o más lentes objetivos de distintos aumentos por microscopio.

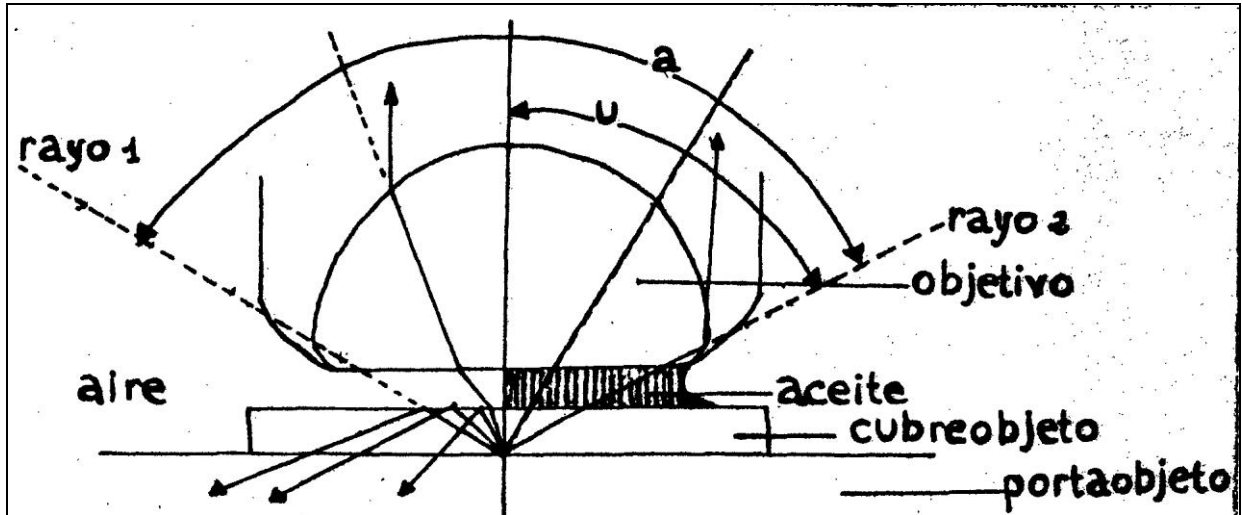
Pueden ser fundamentalmente de dos tipos:

- Secos: aquellos en los cuales la luz llega después de haber atravesado el preparado y la capa de aire que lo separa de él.
- De Inmersión: aquellos en los que se elimina la difracción que los rayos de luz experimentan al atravesar la capa de aire, uniendo la punta del objetivo y el preparado con un líquido, aceite de cedro o simplemente aceite de inmersión.

Propiedades de los objetivos:

Apertura numérica:

En la figura siguiente se representa el lente frontal de un objetivo, un portaobjeto y su correspondiente cubreobjeto. La distancia que separa el lente del cubreobjeto está ocupada por aire en su mitad izquierda y por aceite de cedro en su mitad derecha.



El ángulo "a", formado por los rayos 1 y 2 (los más alejados que pueden entrar en el objetivo), es la medida de la APERTURA de este lente. El ANGULO DE APERTURA (u) es el semiángulo de "a". La magnitud de este ángulo no se expresa en grados sino en el valor trigonométrico del seno del mismo.

La apertura numérica es una característica propia de cada objetivo, es por esto que forma parte de las inscripciones grabadas en los objetivos.

Con el valor de la AN se puede calcular el LIMITE DE RESOLUCION de un sistema óptico, como se verá mas adelante. La cantidad de luz que penetra en un objetivo depende de la apertura numérica. De dos objetivos de igual poder (aumento) el de mayor AN dará una imagen más luminosa.

Las características ópticas de un microscopio están determinadas por la apertura numérica y el aumento de sus lentes.

Resolución:

El microscopio no solo produce un aumento del tamaño de la imagen sino que pone de manifiesto o resuelve detalles estructurales del objeto observado, que no se aprecian a simple vista.

El PODER RESOLUTIVO es la capacidad de las lentes de distinguir o resolver con nitidez dos puntos próximos ubicados en el plano del objeto.

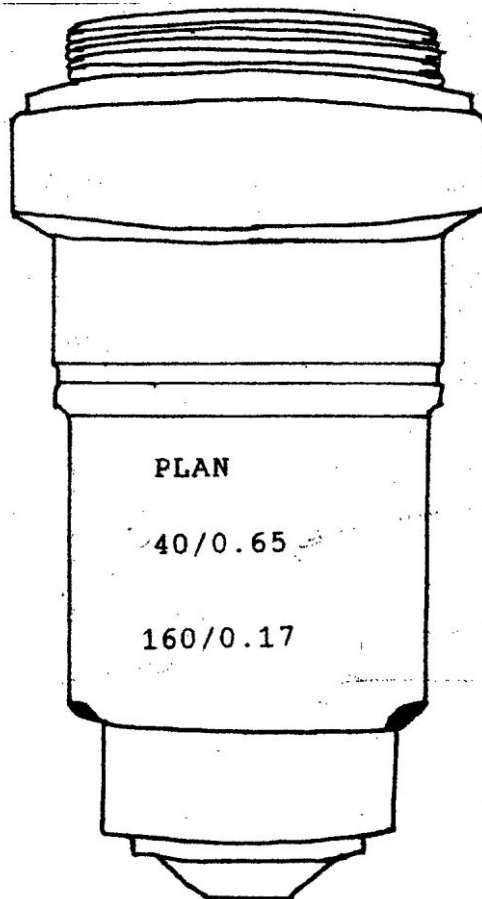
Cuanto mayor es el PR, menor puede ser la distancia que separa dos puntos entre si, sin que estos se confundan.

Límite de resolución:

EL LIMITE DE RESOLUCION se define con la menor distancia que debe existir entre dos puntos vecinos para que puedan ser vistos o discriminados como entidades separadas por ese instrumento.

Inscripciones grabadas en los objetivos:

Los objetivos tienen una serie de indicaciones grabadas en los mismos. En el ejemplo que muestra la figura siguiente: el número 40 indica el aumento del objetivo. Si el aumento producido por el objetivo se lo multiplica por el aumento registrado en el ocular, se obtiene el AUMENTO TOTAL del microscopio. El número 0.65 es la apertura numérica. El número 160 indica la longitud mecánica del tubo (distancia en milímetros desde la superficie de enroscado del objetivo hasta la base del ocular) y el número 0.17 indica el espesor del cubreobjeto que se debe utilizar, expresado en milímetros ($0.17 + / - 0.01$ mm).



- b) Oculares: es el conjunto de lentes que multiplica el aumento del objetivo. Puede haber varios oculares cambiables por microscopio. Los más comunes son 5x, 10x y 15x.

Sistema de iluminación:

- a) Fuente de luz: puede estar o no incorporada al microscopio. Si no lo está puede usarse una lámpara común o el sol.
- b) Espejo: se usa en microscopios sin luz incorporada. Su función es reflejar hacia la preparación la luz proveniente de la fuente. Generalmente es plano de un lado y cóncavo del otro. El primero se utiliza cuando se usa el condensador o cuando la intensidad de la luz es insuficiente.
- c) Condensador: se halla debajo de la platina. Concentra el haz luminoso en la apertura de la platina. Está constituido por una o más lentes. Su posición puede regularse a voluntad por un tornillo que permite acercarlo o alejarlo de la platina.
- d) Diafragma: regula la cantidad de luz que llega a la preparación. Cuando está abierto permite el paso de más luz, pero la imagen que se logra es de poca profundidad. A medida que se va cerrando, la imagen se va definiendo mejor.

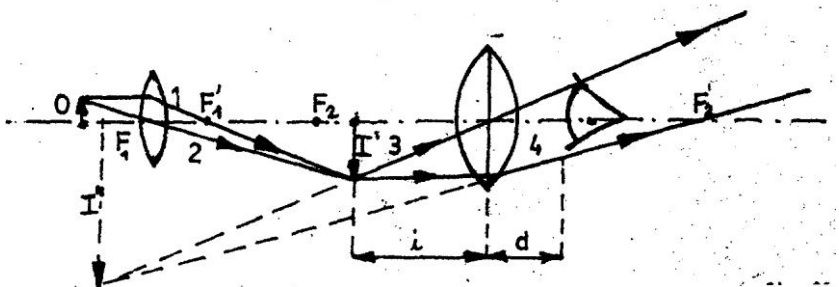
SISTEMA DE AUMENTOS:

El aumento primario del objeto es producido por el aumento objetivo y la imagen se transmite del ocular, donde se realiza el aumento final.

El aumento total de un microscopio compuesto es el producto del aumento de su objetivo y de su ocular. Con un objetivo que aumenta $\times 40$ y un ocular que aumenta $\times 10$, el aumento es de $\times 400$.

Formación de la imagen

Es posible obtener aumentos mayores empleando dos lentes convergentes en serie como se muestra en la siguiente figura. Un sistema de ese tipo se llama microscopio compuesto, y la idea básica de su funcionamiento es muy sencilla. Consiste fundamentalmente en formar primero una imagen real agrandada del objeto que se quiere observar, y luego mirar esa imagen con un microscopio simple (lupa). Así el aumento final será el resultado de dos aumentos, cada uno de los cuales es mucho menor que el total, y por lo tanto no crea graves problemas de aberraciones cuando se diseñan las lentes.



La primer lente, es decir la más cercana al objeto se llama objetivo, y en los buenos microscopios está constituido por varias lentes delgadas adosadas para que en conjunto reduzcan a un mínimo las aberraciones.

La segunda lente se llama ocular, y es también por las mismas razones, un sistema de lentes cuyas aberraciones han sido cuidadosamente corregidas. El objetivo es un sistema convergente de pequeña distancia focal, y el objeto fuertemente iluminado por un sistema condensador, se lo coloca un poco más alejado de la lente que el primer foco (F_1). De esta manera se obtiene una imagen real, invertida y aumentada I' del objeto O . Esta imagen se forma en un plano un poco más cerca del ocular que su primer foco, con lo cual se forma de ella una nueva imagen ahora virtual, derecha y nuevamente aumentada I'' . Es común en el diseño de un microscopio proyectarlo de manera tal que la imagen final I'' se forme a la distancia óptima de visión distinta, es decir normalmente a 25 cm. Esta imagen final está invertida respecto del objeto inicial.