

SESIÓN 3:

MICROSCOPIO

TRABAJO PREVIO

○ CONCEPTOS FUNDAMENTALES

En esta sección se describen algunas de las características del microscopio compuesto. También la propiedad de las láminas planoparalelas de desplazar la imagen respecto al objeto.

- **Elementos constituyentes**

El microscopio compuesto es un instrumento óptico formado por tres partes esenciales: *sistema de iluminación*, *objetivo* y *ocular*. En la figura 3.1 pueden observarse estos componentes. La marcha de rayos en un microscopio compuesto convencional, sin tener en cuenta el sistema de iluminación, se muestra en la figura 3.2.

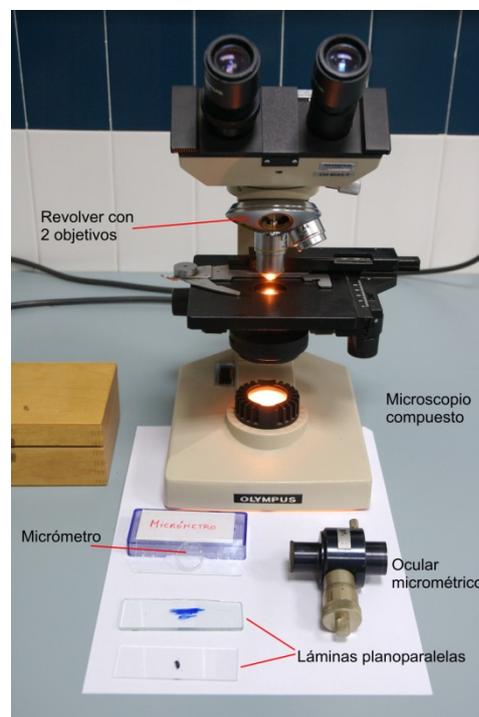


Figura 3.1. Material disponible.

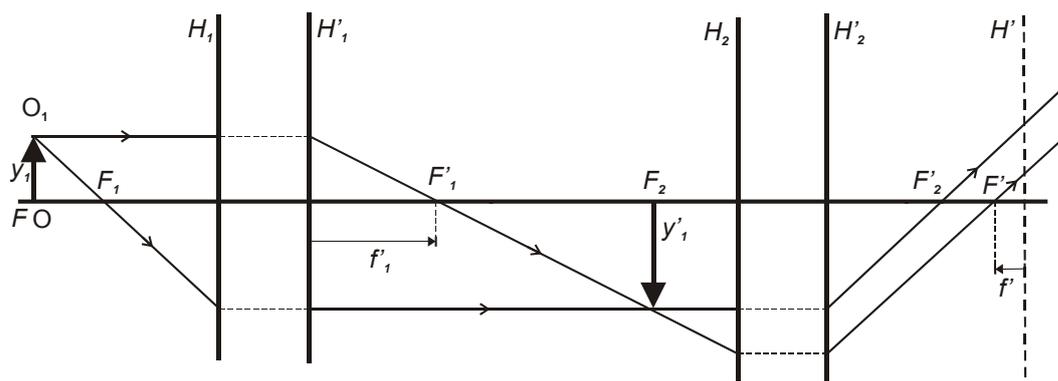


Figura 3.2. Marcha de rayos en un microscopio compuesto sin tener en cuenta el sistema de iluminación del instrumento.

El sistema de iluminación varía de unos microscopios a otros. En general hay dos sistemas de iluminación frecuentemente empleados, denominados de **iluminación crítica** e **iluminación Köhler**. En microscopios es habitual que la iluminación sea de tipo iluminación crítica. En el microscopio utilizado en la práctica el sistema de iluminación, de tipo crítica, está formado por una lámpara de intensidad variable, un diafragma y un condensador. El condensador es un conjunto de lentes que tienen como misión dirigir la luz de la fuente para iluminar intensamente el objeto. La imagen que el condensador da del diafragma queda sobre la platina (o pletina) en la que se coloca el objeto.

• Aumentos

El objetivo es una pieza fundamental del microscopio. Necesita una esmerada corrección de aberraciones. El microscopio que utilizará dispone de un revolver con capacidad para cuatro objetivos intercambiables, de los que está montado uno, de 10 aumentos (10x). El aumento del objetivo de un microscopio es el aumento lateral del mismo, y viene dado por la expresión:

$$\beta'_{ob} = \frac{y_1'}{y_1} \quad (3.1)$$

donde y_1 es el tamaño del objeto, e y_1' es el tamaño de la imagen intermedia. La imagen intermedia es la imagen que produce el objetivo, y actúa como objeto para el ocular. Aunque este aumento lateral es negativo, pues la imagen generada por el objetivo es invertida como indica la figura 3.2, el signo no se indica en el aumento que está grabado en los objetivos.

❖ El aumento marcado en los objetivos corresponde a un intervalo óptico de 160 mm, que es el usualmente utilizado en los microscopios.

El ocular, al igual que el objetivo, es un sistema convergente. Dependiendo de la utilización que se vaya a hacer del microscopio pueden usarse diferentes oculares, pues son intercambiables. El más común es el llamado ocular de Huygens. El aumento del ocular de un microscopio compuesto es el

aumento visual normal o comercial del ocular, dado por la expresión:

$$\Gamma'_{oc} = \frac{250 (mm)}{f'_{oc} (mm)} \quad (3.2)$$

A fin de corregir aberraciones, en el microscopio compuesto el objetivo y el ocular no son realmente lentes únicas, sino que cada uno de ellos son sistemas compuestos por varias lentes. El objetivo y el ocular están dispuestos de forma que la imagen del objeto a través del objetivo (imagen intermedia) se sitúe sobre el foco objeto del ocular. Por tanto, la imagen final se sitúa en el infinito, o lo que es lo mismo, los haces de rayos emergen paralelos del ocular. De esta forma los rayos inciden en el ojo como si procedieran del infinito, teniéndose así una visión descansada, con el ojo relajado o enfocado al infinito (sin acomodación). El aumento total del microscopio es el producto del aumento del objetivo (expresión (3.1)) por el del ocular (expresión (3.2)). Como la imagen final es invertida respecto del objeto, el aumento total es negativo. La inversión de la imagen no suele ser ningún problema para los usos habituales del microscopio compuesto.

❖ En el lenguaje usual se omite el signo y se habla de un microscopio de, por ejemplo, 25 ó 50 aumentos. Se supone que el usuario sabe que dichas cifras son en realidad negativas.

• Apertura numérica

En general, para un sistema óptico se define la apertura numérica como:

$$A.N. = n \sin \sigma \quad (3.3)$$

donde n es el índice del espacio objeto y σ , el ángulo que forma con el eje el rayo que, partiendo del centro del objeto, pasa por el borde de la pupila de entrada. En nuestro caso, la pupila de entrada es el propio objetivo. La A.N. está relacionada con la anchura angular del cono de luz que entra al objetivo, como se puede observar en la figura 3.3.

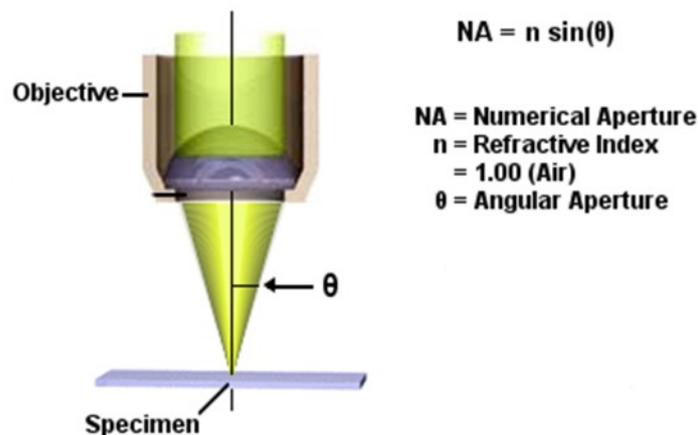


Figura 3.3. Apertura numérica del objetivo.

- **Poder resolutivo**

El poder resolutivo de un instrumento está relacionado con la capacidad de resolver (ver separados en la imagen) dos puntos objeto. A mayor poder resolutivo de un instrumento mayor capacidad para formar imágenes en las que se pueden distinguir los detalles del objeto. En el caso del microscopio, el poder resolutivo del objetivo se relaciona con la menor distancia r entre dos puntos del plano objeto que son justamente resueltos en la imagen. Dicha distancia viene dada por la expresión:

$$r = \frac{0.61 \lambda}{n \sin \sigma} = \frac{0.61 \lambda}{A.N.} \quad (3.4)$$

Se considera que un instrumento tiene mayor poder resolutivo que otro si la distancia mínima r que es capaz de resolver es menor.

- **Piñón de enfoque**

En el microscopio que utiliza es posible medir desplazamientos en el enfoque solamente cuando mueve la rueda de enfoque “fino”. Tenga en cuenta que si mueve la rueda del enfoque “grosso” no podrá medir el desplazamiento realizado. La rueda de enfoque fino tiene una escala asociada, como puede observar en la figura 3.4. Teniendo en cuenta que cada división del piñón de enfoque equivale a un determinado desplazamiento de la platina (dependiendo de cada microscopio), podemos medir desplazamientos de la platina con mucha precisión. Como ejemplo, en el microscopio de la figura 8.3 una vuelta completa de esta rueda produce un desplazamiento del plano de enfoque de $200 \mu\text{m}$. La escala asociada tiene 80 divisiones por vuelta, cada una de ellas de $2.5 \mu\text{m}$ ($200 \mu\text{m}/80$). Por tanto, 1 división produce un desplazamiento del plano de enfoque de $2.5 \mu\text{m}$ ($1 \mu\text{m}=10^{-6} \text{m}$).

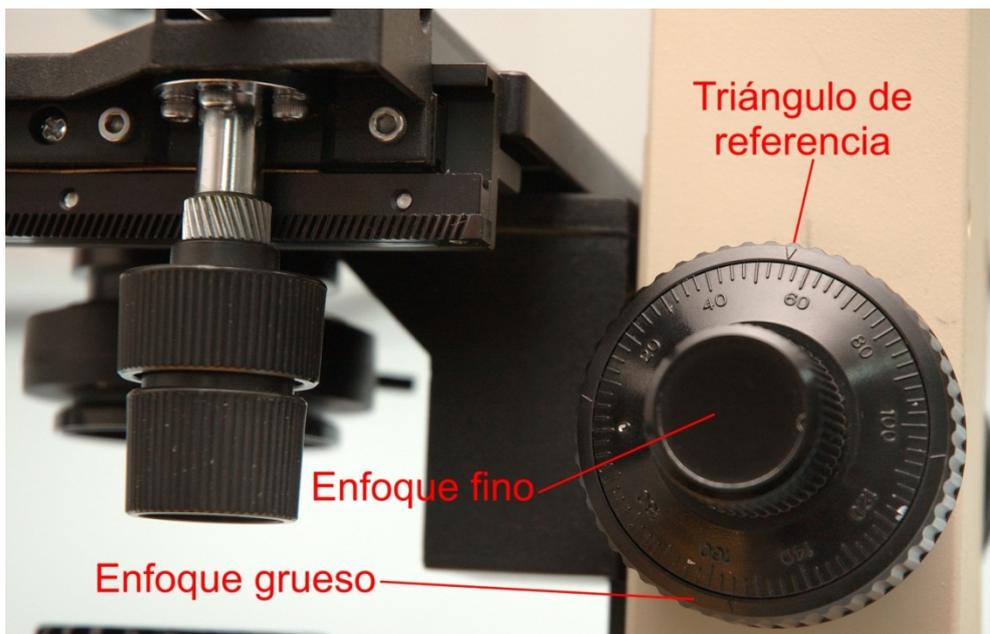


Figura 3.4. Mecanismo de enfoque del microscopio compuesto.

Para realizar las medidas de distancias que necesitará deberá contar las vueltas completas y el número de divisiones que ha realizado con el ajuste fino. Para contar utilice uno de los triángulos pequeños de referencia que se encuentran en el borde de la rueda de enfoque grueso (ver figura 3.4).

- **Lámina plano-paralela**

Una lámina planoparalela es un sistema óptico con dos superficies planas y paralelas (es decir, dos dioptrios planos paralelos entre sí), siendo iguales los índices de refracción extremos (usualmente el aire). Para un objeto cualquiera, una lámina planoparalela produce una traslación de los rayos que proceden de él, lo que genera una imagen del mismo tamaño que el objeto, desplazada respecto a éste una distancia $\Delta s'$, que en aproximación paraxial viene dada por:

$$\Delta s' = d \cdot \left(1 - \frac{1}{n}\right) \quad (3.5)$$

donde d es el espesor de la lámina y n su índice de refracción.

○ **CUESTIONES**

- 1.- Indica algún otro instrumento óptico más simple que permite ver aumentadas las imágenes de objetos cercanos, y explica su funcionamiento.
- 2.- Justifica las ventajas de los objetivos de inmersión, para los que se sumerge la muestra y el objetivo en un aceite de alto índice.
- 3.- Indica el límite superior teórico para la A.N. para muestras sumergidas en aire.
- 4.- ¿Por qué crees que los microscopios electrónicos resultan muy superiores a los ópticos convencionales?

GUIÓN DE LA SESIÓN: MICROSCOPIO

○ OBJETIVO

Hacer un estudio de las características más importantes del microscopio compuesto: aumento, apertura numérica y poder resolutivo del objetivo. Además utilizarlo para medir el índice de refracción de una lámina plano paralela.

○ MEDIDA DEL AUMENTO DEL OBJETIVO

Ha de medir el aumento de los dos objetivos del microscopio. Note que no va a medir el aumento total del microscopio. Según la expresión (3.1), utilizando un objeto de tamaño conocido y midiendo el tamaño de la imagen intermedia, podrá calcular el aumento de cualquier objetivo.

Utilice como objeto el micrómetro, situándolo en la platina sobre un portaobjetos, como muestra la figura 3.5. Utilizando un ocular especial, llamado micrométrico, puede medir el tamaño de la imagen intermedia. Ha de reemplazar el ocular del fabricante por el ocular micrométrico, como observa en la figura 3.6.

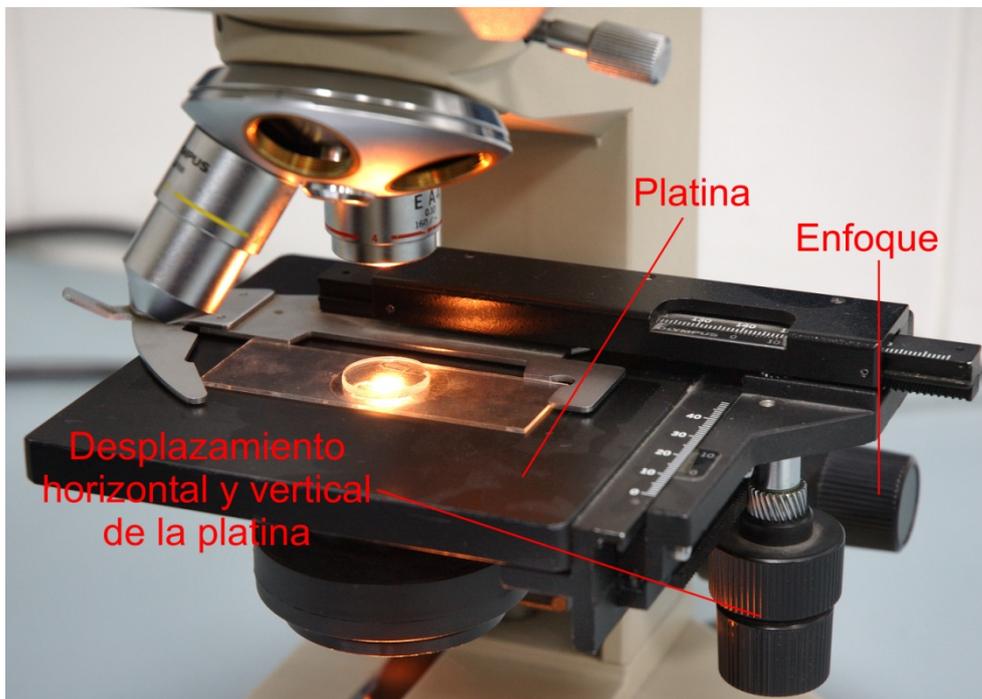


Figura 3.5. Detalle del micrómetro sobre la platina y del revólver de objetivos.

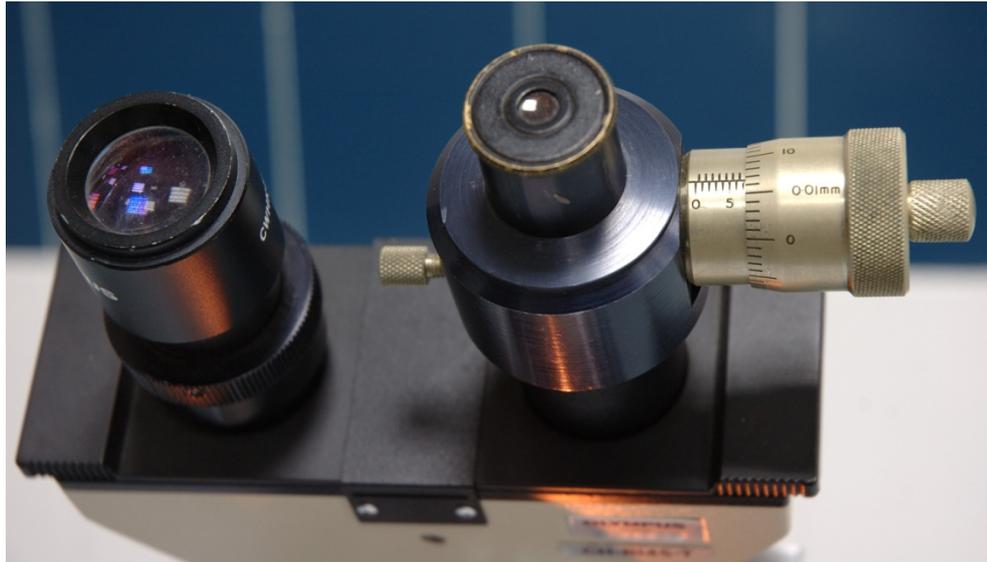


Figura 3.6. Ocular micrométrico reemplazando el ocular derecho del microscopio.

Observando sólo por el ocular micrométrico (observación monocular) y haciendo uso del mecanismo de enfoque del microscopio debe observar nítidamente el micrómetro. Por la limitación del campo en realidad observará sólo una parte del mismo. El micrómetro es una escala de precisión tal que, según el fabricante, la distancia entre dos líneas consecutivas es 0.01 cm. No está disponible la precisión de este dato, por lo que puede considerar dicha distancia sin incertidumbre. Elija como objeto un determinado número de divisiones de la escala del micrómetro.

- ❖ Razone, desde el punto de vista de la incertidumbre de la medida, si sería preferible un tamaño de objeto grande o pequeño.

Para medir el tamaño de la imagen intermedia utilice el ocular micrométrico. Es un ocular con un retículo móvil situado en su plano focal objeto. El retículo se desplaza mediante un tornillo micrométrico de precisión. El ocular micrométrico del que dispone (figura 3.6) tiene un tornillo micrométrico con 50 divisiones y una vuelta completa del tornillo produce un desplazamiento del retículo de 0.5 mm. Por tanto, cada una de las divisiones del tornillo micrométrico produce un desplazamiento del retículo de 0.01 mm (sensibilidad del instrumento).

- ❖ Para medir correctamente haga que las líneas del micrómetro sean paralelas al trazo del retículo que se desplaza con el tornillo, como se observa en la figura 3.7. Lo puede conseguir girando el ocular micrométrico (o el micrómetro). A continuación fije el ocular micrométrico al tubo del microscopio, mediante el tornillo adecuado.

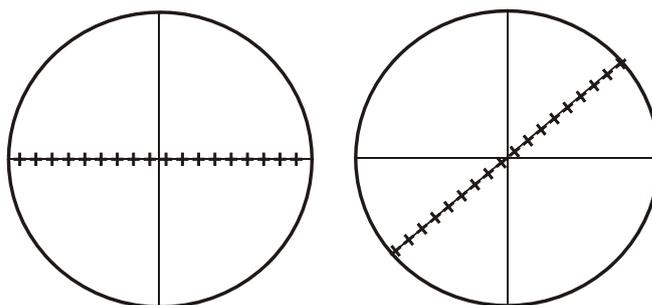


Figura 3.7. Alineamiento correcto (izquierda) e incorrecto (derecha) del micrómetro con el retículo del ocular micrométrico.

Sitúe el brazo móvil del retículo sobre una de las líneas del micrómetro y anote la medida relativa de la escala del tornillo micrométrico. Esta medida no corresponde con la medida de una distancia, sino de una posición. Mueva el retículo hasta otra línea del micrómetro, que puede ser la línea contigua, o un número determinado de líneas. Vuelva a medir la posición relativa del tornillo micrométrico. La diferencia entre las dos medidas es el tamaño de la imagen intermedia y_1' . Debido a que las líneas del micrómetro tienen un cierto grosor las medidas de y_1' pueden tener una dispersión elevada. Como siempre, deberá hallar dicha dispersión para determinar el número de medidas necesarias, la incertidumbre de y_1' , etc. Tenga en cuenta que como mínimo la incertidumbre asociada a y_1' será de 0.02 mm, ya que al medir cada uno de los extremos del segmento de la imagen hay una incertidumbre de al menos 0.01 mm. El tamaño del objeto correspondiente a la imagen medida será el número de divisiones consideradas multiplicado por 0.01 cm, que es la distancia entre cada dos líneas.

❖ Recuerde que los porcentajes de dispersión deben hallarse sobre las medidas de y_1' , no sobre las medidas de las posiciones correspondientes a cada uno de los extremos de y_1' .

Mediante la expresión (3.1) calcule el aumento del objetivo. Realice todo el proceso para cada uno de los dos objetivos disponibles. Compare los aumentos medidos con los valores proporcionados por el fabricante de los objetivos, escritos en los mismos.

○ MEDIDA DE LA APERTURA NUMÉRICA Y DEL PODER RESOLUTIVO DEL OBJETIVO

Colocamos en el microscopio su propio ocular. Procederemos, en primer lugar, a calcular el espesor d de una lámina plano-paralela ya que en el método que describiremos posteriormente necesitamos conocer dicho espesor. Para calcular el índice de refracción necesita también medir el espesor d de la lámina problema, que es la distancia OA en la figura 3.8. Es posible utilizar también el microscopio para medir esta distancia, pues será mucho más exacto que si utiliza, por ejemplo, un calibre. Para medir el espesor OA primero

enfocamos el objeto O , que es el trazo realizado en la cara de arriba de una lámina planoparalela auxiliar. Para este enfoque utilice el enfoque grueso al principio y el enfoque fino para mejorarlo. Haga un trazo A en la cara de arriba de la lámina planoparalela a la que le está midiendo el espesor, como se observa en la figura 3.8. Coloque dicha lámina encima de la lámina auxiliar. Tome nota de la posición en que está la rueda de enfoque fino y moviendo solamente la rueda del enfoque fino enfoque A . Con la escala del mecanismo de enfoque fino, contando el número de vueltas y de divisiones mida la distancia OA , que es el espesor d de la lámina.

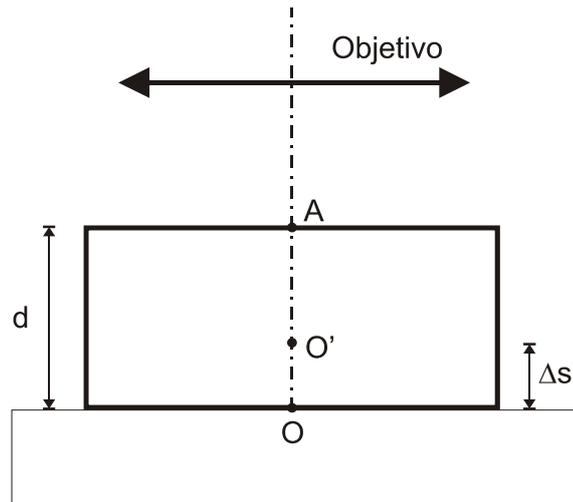


Figura 3.8. Esquema del desplazamiento de la imagen respecto al objeto producido por una lámina planoparalela.

Se sitúa ahora sobre la platina el micrómetro, y sobre él la lámina a la que le hemos medido el espesor. Enfocamos la marca sobre la cara superior de la lámina (A). Los rayos marginales delimitarán el ángulo de apertura 2α del cono luminoso que penetra en el objetivo, como se observa en la figura 3.9. Además, dado que el micrómetro está situado debajo de la lámina, el objetivo forma una imagen M' del mismo, que no podemos apreciar porque el plano imagen que observamos a través del ocular es A' , que no coincide con la posición de M' .

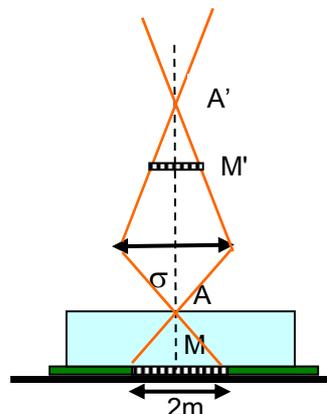


Figura 3.9. Esquema para la medida de la apertura numérica.

Si quitamos ahora la lámina y también el ocular del microscopio, sin mover el piñón de enfoque, podremos ver ya la imagen M' de la escala M , cuya dimensión queda fijada por los rayos marginales del haz central (en naranja en la figura 3.9). En esta imagen se puede leer la longitud $2m$ de la escala. Para poder ver M' , se puede utilizar el tubo con un agujero de pequeño diámetro, o podemos incluso observarla a simple vista mientras tomemos la precaución de no acercarnos demasiado al microscopio, ya que entonces nuestro ojo no es capaz de enfocar la imagen que flota en el tubo. Una vez localizada M' determinamos su tamaño contando el número de divisiones visibles del micrómetro que contiene ($2m$). Es muy importante no mover la posición de la cabeza mientras observamos la imagen, pues esto puede alterar la medida. El ángulo σ vendrá dado por la expresión (3.6) a partir de la cual se puede calcular la apertura numérica aplicando la ecuación (3.3).

$$\operatorname{tg} \sigma = \frac{m}{d} \quad (3.6)$$

Una vez calculada la apertura numérica, teniendo en cuenta la definición de poder resolutivo dada anteriormente (ecuación (3.4)), podemos calcular éste para la longitud de onda central del espectro visible (555 nm).

○ MEDIDA DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN DE UNA LÁMINA PLANOPARALELA

Según la expresión (3.5), puede calcularse el índice de refracción de una lámina planoparalela midiendo el espesor d de la lámina y el desplazamiento que produce en la imagen $\Delta s'$. El espesor y el desplazamiento se designan como OA y OO' respectivamente en el esquema de la figura 3.8. La medida de estas dos distancias se puede realizar con gran precisión mediante el mecanismo de enfoque de un microscopio.

Reemplace el ocular micrométrico utilizado en la parte anterior de la práctica por el ocular del microscopio que suministra el fabricante. Es conveniente que realice las siguientes observaciones de forma binocular. Elija un portaobjetos y realice un trazo O en su cara superior con un bolígrafo o rotulador, como se muestra en la figura 3.8. El trazo O será el objeto y es importante que considere que el portaobjetos en que se ha realizado el trazo O no es la lámina cuyo índice de refracción quiere calcular. Sitúe dicho portaobjetos en la platina y enfoque el trazo O utilizando el enfoque grueso al principio y el fino para mejorarlo.

Seguidamente coloque la lámina planoparalela a la que le va a medir el índice de refracción sobre el portaobjetos anterior. Observará que la imagen del objeto ya no está correctamente enfocada, debido al desplazamiento en la imagen que produce la lámina planoparalela. Para medir este desplazamiento tome nota de la posición en que está la rueda de enfoque fino. A continuación mueva solamente la rueda del enfoque fino hasta ver nítidamente O' , que es la imagen producida por la lámina planoparalela del objeto O . Cuente el número de vueltas y de divisiones hasta ver O' nítidamente enfocado. Esta medida

corresponde a la distancia OO' , que es el desplazamiento $\Delta s'$ de la expresión (3.5).

Para calcular el índice de refracción necesita también medir el espesor d de la lámina problema, que ya ha realizado anteriormente para calcular la apertura numérica.

❖ Si lo prefiere, puede medir de otra forma la distancia OA como suma de las distancias OO' (anteriormente medida) y $O'A$.

De acuerdo con la expresión (3.5) y la figura 3.8, puede calcular el índice de refracción de la lámina planoparalela mediante la fórmula:

$$n = \frac{d}{d - \Delta s'} = \frac{OA}{OA - OO'} \quad (3.6)$$

❖ La medida del índice de refracción es independiente del aumento del objetivo que emplee, aunque no la precisión de las medidas, que será mayor cuanto más aumento tenga el objetivo.

Para el cálculo de incertidumbres tenga en cuenta que la incertidumbre mínima asociada a cualquier distancia medida con el mecanismo de enfoque fino será de $5 \mu\text{m}$, ya que cualquier distancia es el resultado de 2 enfoques, cada uno de los cuales tiene una incertidumbre de al menos $2.5 \mu\text{m}$.

Si ha realizado las medidas correctamente, el índice de refracción que obtenga deberá estar en el rango correspondiente a los vidrios ópticos ordinarios (entre 1.4 y 2.0, aproximadamente). También puede serle útil pensar que, si ha usado como lámina problema un portaobjetos convencional, el espesor OA debe ser del orden de 1 mm ($1000 \mu\text{m}$), equivalente a 5 vueltas completas del mecanismo de enfoque fino del microscopio.