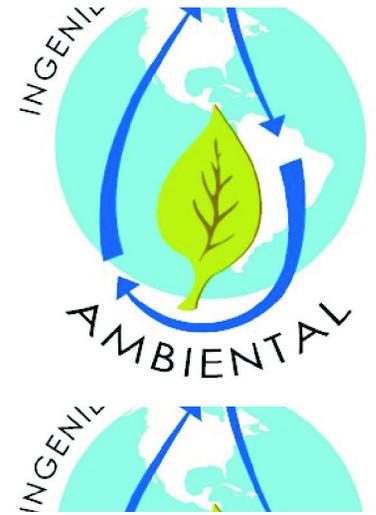




# BIOLOGÍA

## PRÁCTICA 1



# *Microscopía*

Profesora Responsable

Dra. Elcia Brito

2015

# Objetivo general

Conocer la herramienta básica de la biología, el microscopio.

## Objetivos específicos

Comprender la parte física del microscopio, es decir, como se forma la imagen.

Conocer los diferentes tipos de microscopios y sus aplicaciones

Identificar una imagen sacada al microscopio y correlacionar al tipo de microscopio

Identificar partes de la célula a partir de fotos sacadas al microscopio

## El microscopio:

Relaciones de tamaño

Histórico

Tipos de microscopio

M Óptico simples

M. Óptico compuesto

MO de campo oscuro

MO de contraste de fases

MO de Microscopio Diferencial de

Contraste de Interferencia

MO de Fluorescencia

Microscopio electrónico

ME de transmisión y ME de Barrido

## Tamaño celular

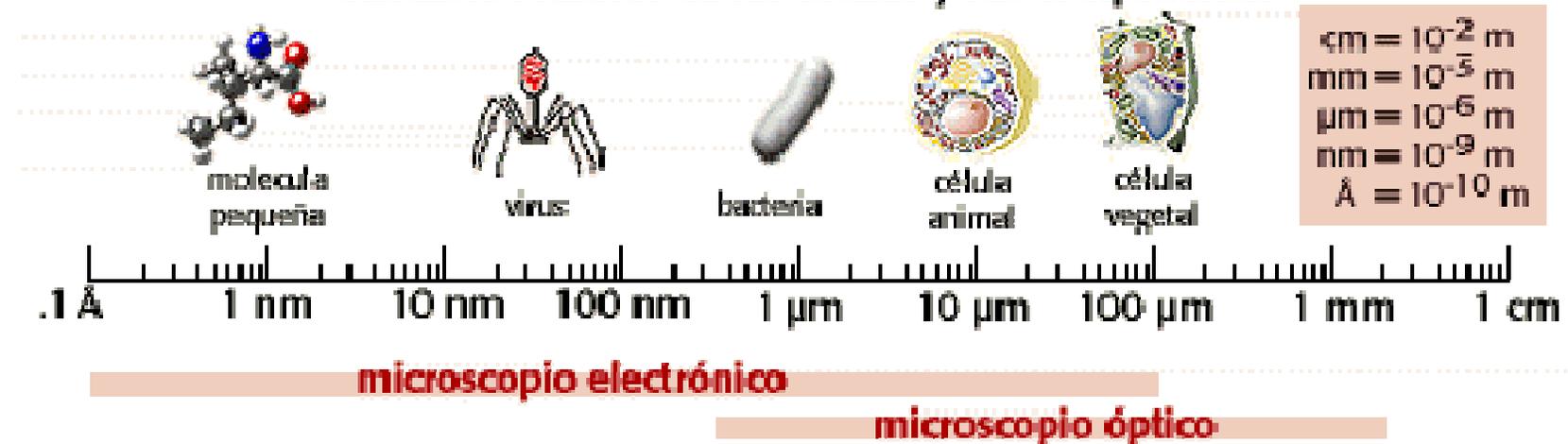
Las células son las unidades básicas de los seres vivos.

El poder resolutivo del ojo humano es de 0.2 mm (200  $\mu\text{m}$ ), o sea la menor distancia vista o resuelta por el ojo humano es de dos líneas separadas 1mm de distancia.

Si hay dos líneas a 200  $\mu\text{m}$  de distancia,  
veremos una sola línea.

Entonces, para se observar cosas menores que 200  $\mu\text{m}$  se utilizan los microscopio

### Tamaños relativos de las células y sus componentes

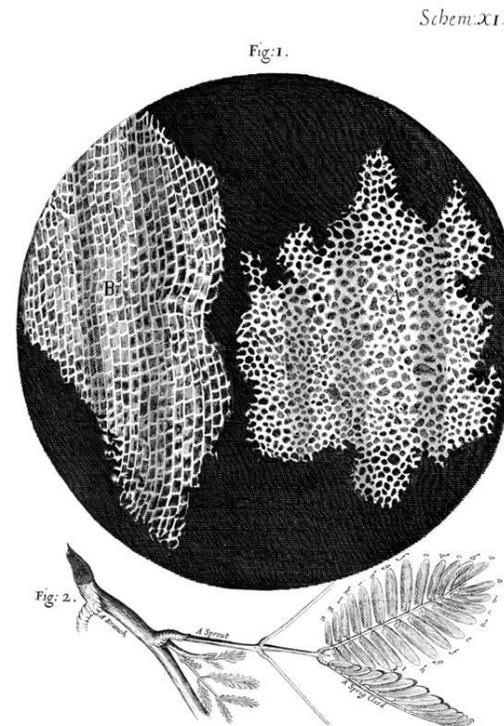
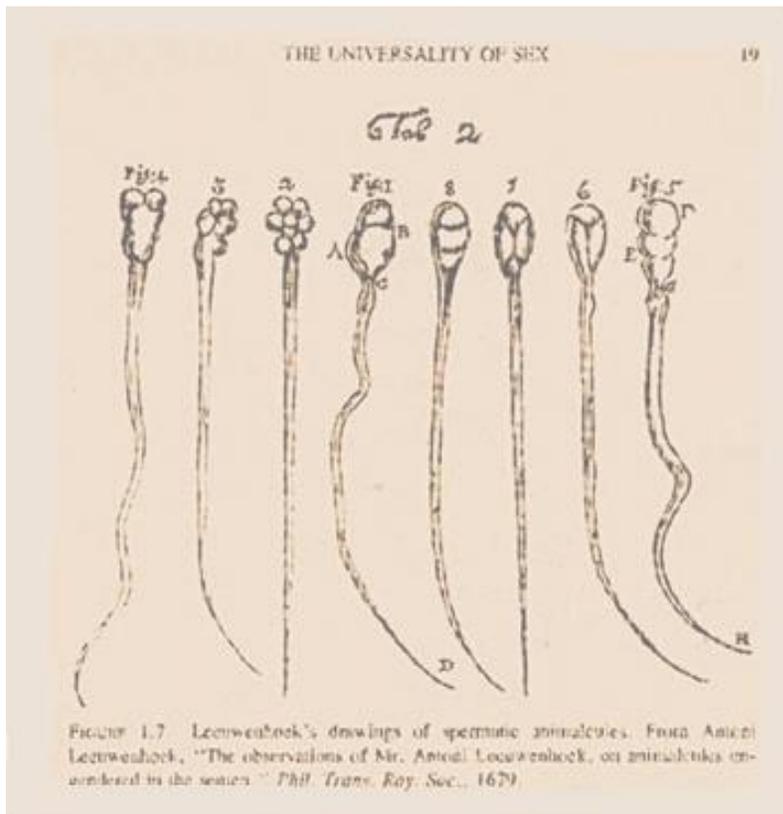


## 1. El microscopio: Histórico

No se sabe al cierto quien inventó el microscopio. Se creen que se pasó en Midelburg, en los Países Bajos, entre 1590 y 1610. Los nombres más citados son los de **Hans y Zacharias Janssen**.

Los usuarios más conocidos fueron **van Leeuwenhoek** and **Hooke**.

**Van Leeuwenhoek** utilizaba lentes sencillas, pero de mucha mayor resolución que el microscopio utilizado por Hooke.

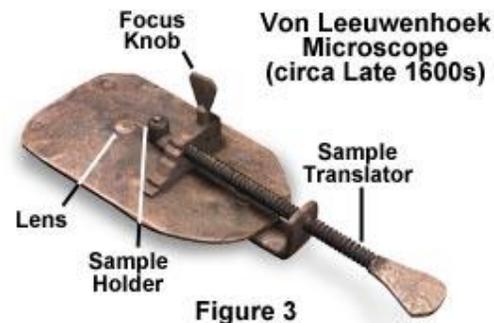


## 1. El microscopio: Histórico

**Antoni van Leeuwenhoek**, nació y murió en Delft, Holanda (24 de octubre 1632 – 26 de agosto 1723) a la edad de casi 91 años.

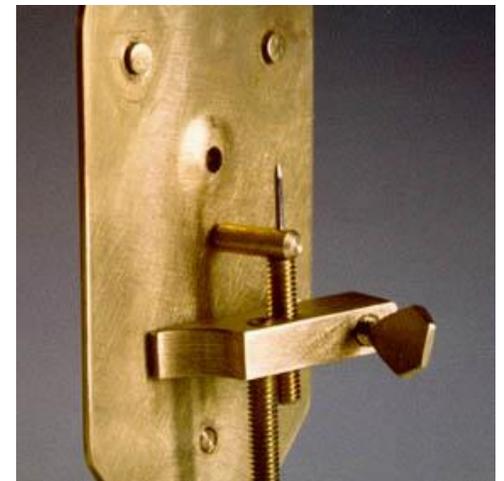
Durante su vida fabricó más de 500 lentes, algunas de ellas de hasta 480 aumentos (potencia que excedía con mucho la de los primeros microscopios de lentes múltiples).

Construyó las telas lupas de mejor calidad que las que se podían conseguir ( con pulido de vidrio). Desarrolló pequeñas lentes biconvexas montadas sobre platinas de latón, que se sostenían muy cerca del ojo. A través de ellos podía observar objetos, que montaba sobre la cabeza de un alfiler.



Antoni van Leeuwenhoek,

Fuente: Google, J. Verkolje, 1686, Project Gutenberg ebook of Den Waaragtigen Omloop des Bloeds



[www.microscopy-uk.org.uk](http://www.microscopy-uk.org.uk)

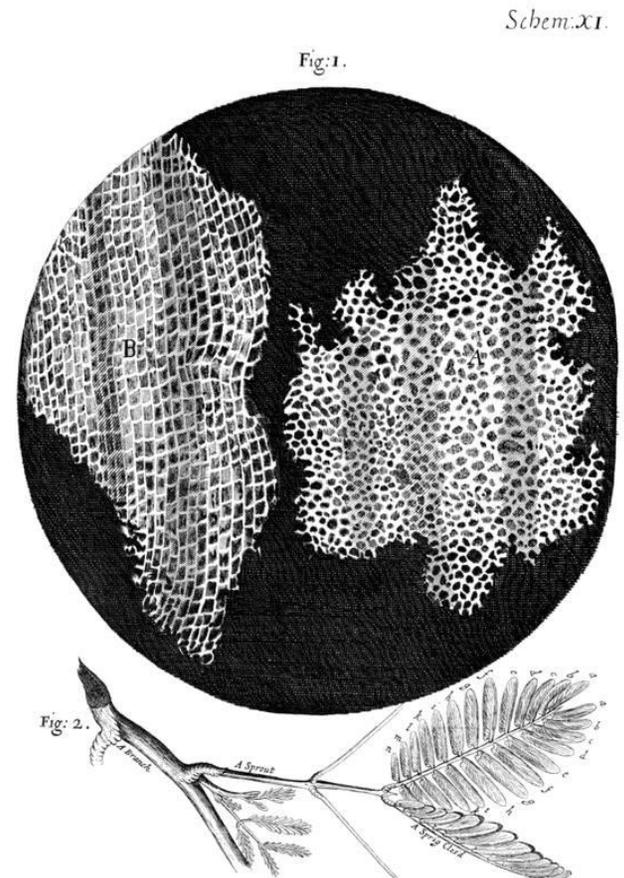
## 1. El microscopio: Historico

**Robert Hooke**, nació en Freshwater, 18 de julio de 1635 y murió en Londres, 3 de marzo de 1703, con apenas 68 años.

Fue uno de los científicos experimentales más importantes de la historia de la ciencia. Sus intereses abarcaron campos tan dispares como la biología, la medicina, la cronometría, la física planetaria, la microscopía, la náutica y la arquitectura.

En 1665 publicó el libro *Micrographía*, con relatos de observaciones microscópicas y telescópicas con detallados dibujos. Este libro contiene por primera vez la palabra **célula**.

Hooke descubrió las células observando en el microscopio una laminilla de corcho, dándose cuenta que estaba formada por pequeñas cavidades poliédricas que recordaban a las celdillas de un panal. Por ello cada cavidad se llamó célula.



## 1. El microscopio: Historico

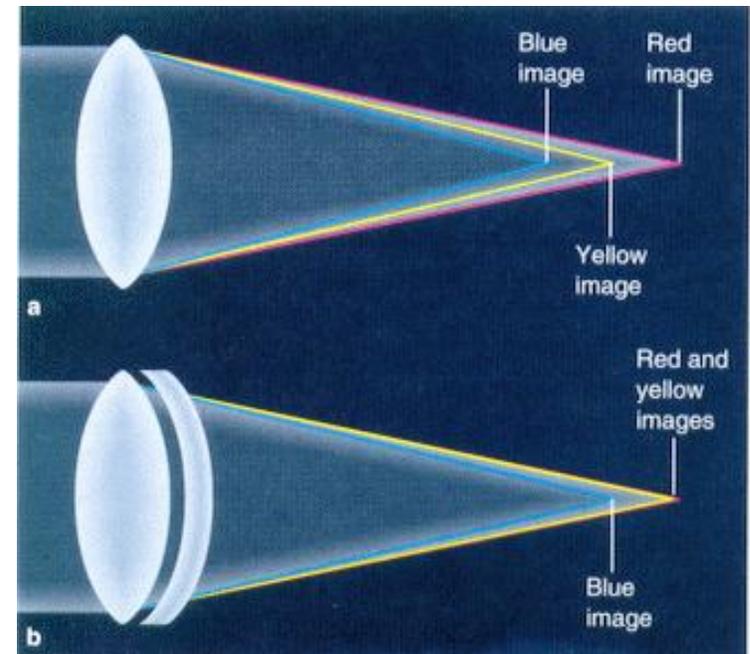
En realidad Hook sólo vio las paredes celulares, ya que este tejido está muerto a la madurez y las células ya no tienen contenido. Mas tarde, Hooock y algunos de sus contemporáneos observaron células vivas.

El mejoramiento del microscopio solo se observó con la invención de las lentes acromáticas, disponibles desde 1929.

La **lente acromática** es una lente en la que se ha corregido el fenómeno de la aberración cromática.

### Aberración cromática

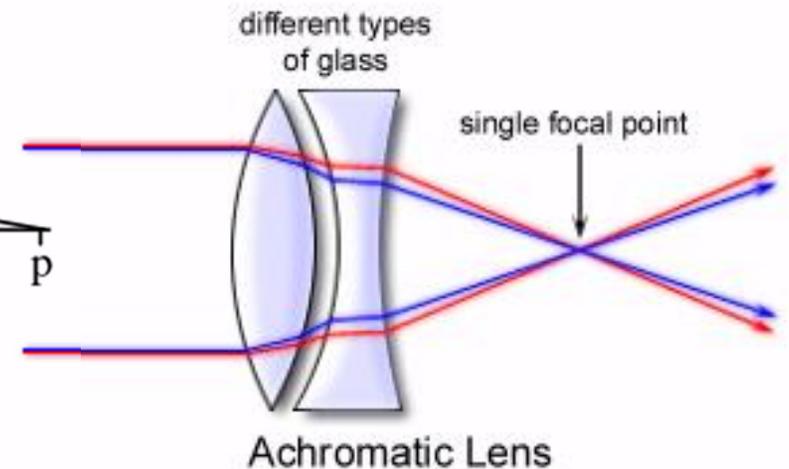
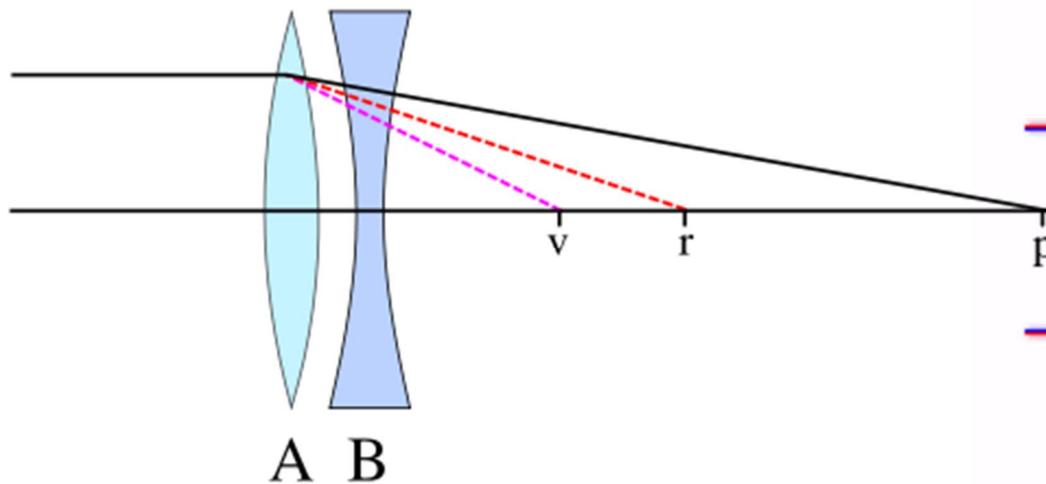
Como el índice de refracción varía con la longitud de onda, la distancia focal de una lente también varía. Cada longitud de onda forma una imagen de tamaño ligeramente diferente.



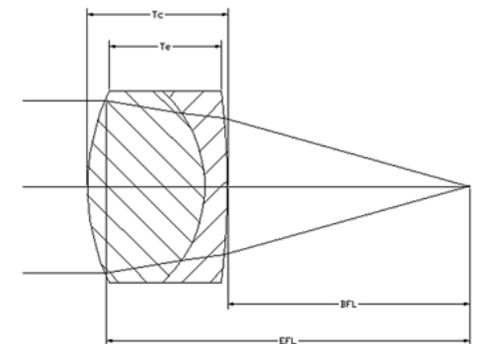
## 1. El microscopio: Histórico

Mediante combinaciones de lentes convergentes y divergentes fabricadas con vidrios de distinta dispersión es posible minimizar la aberración cromática.

En general, en las lentes acromáticas se corrige la aberración cromática para dos o tres colores determinados.



Pero, fue **Jan y Harmanus van Deyl** los primeros a hacer estas lentes tan chicas que para utilizar en las objetivas de los microscopios, esto en 1870.

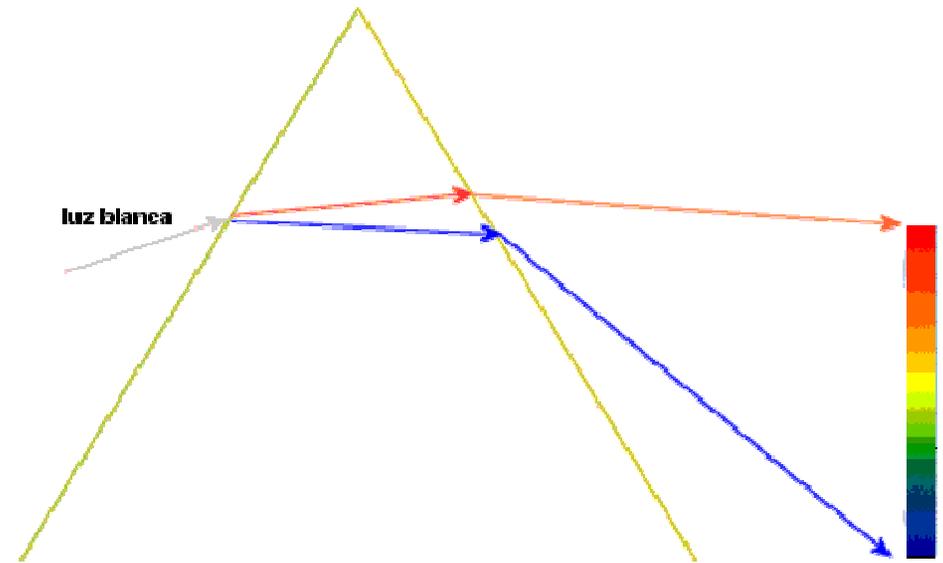


Los estudios de la física de la luz, contribuyó mucho para el desarrollo del microscopio

## La dispersión de la luz

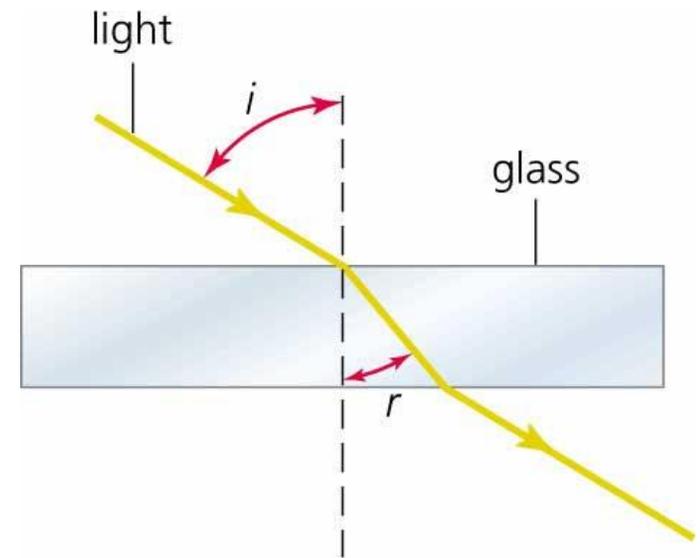
La luz blanca es una mezcla de diferentes colores

La **dispersión** es la descomposición de la luz, la separación de la luz en las longitudes de onda que las componen.



## La refracción de la luz

Cuando la luz pasa a través de materiales de diferentes densidades, la velocidad de la luz cambia ligeramente y esto causa una curva en el rayo y en el interfaz entre los dos materiales.



## 1. El microscopio: Historico

Las mejoras más importantes de la óptica de los microscopio surgieron a partir de los trabajos de **Ernst Abbe** (1877). Estas informaciones fueron utilizadas por **Carl Zeiss Jena**, que mejoró la microscopía de inmersión sustituyendo el agua por aceite de cedro, lo que permite obtener aumentos de 2000.

Debido a estas mejoras la Alemana controla el comercio de la microscopia en el inicio del siglo XIX.

Mejoras del microscopio óptico padrón fueron ocurriendo desde entonces.

**Contraste de fase** por Dutchman Zernike, en **1934**

**Contraste de interferencia** por Nomarsky, en **1953**

Microscopia de **Fluorescencia** en los años **70** (pero el principio fue elaborado en 1904 por Köhler)

El microscopio electrónico de transmisión (T.E.M.) fue desarrollada por **Max Knoll** y **Ernst Ruska** en Alemania en 1931. Posteriormente, en 1942 se desarrolla el microscopio electrónico de barrido (SEM).

Estos utilizan un haz de electrones en lugar de luz para enfocar la muestra consiguiendo aumentos de 100.000 X.

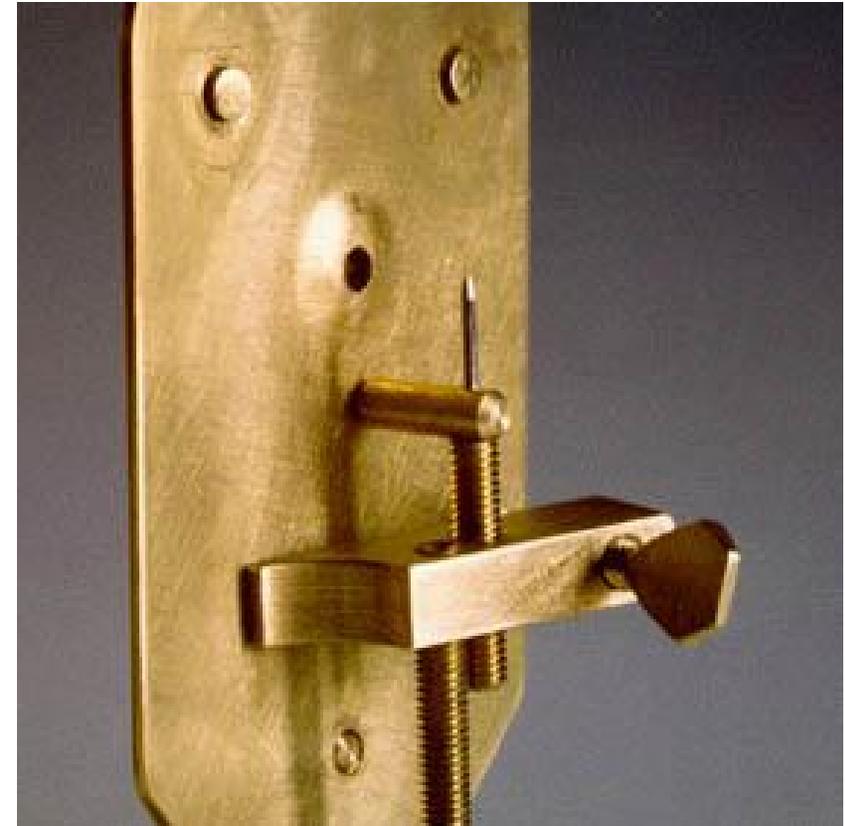
# 1. El microscopio: Tipos de microscopio

## *Microscopio simples*

Es aquel que solo utiliza una lente de aumento

Ej. Una lupa

Anton Van Leeuwenhoek construyó microscopios muy eficaces basados en una sola lente pequeña y convexa, montada sobre una plancha



Sólo sirve para exámenes superficiales (disección de animales, observación de colonias, detección de quistes de parásitos,...). Se consigue un número de aumentos entre 4 y 60.

Lupa binocular estereoscópica  
Ocular 10X y Objetivos de 2X y 4X en torreta giratoria.  
Aumentos de 20 y 40X

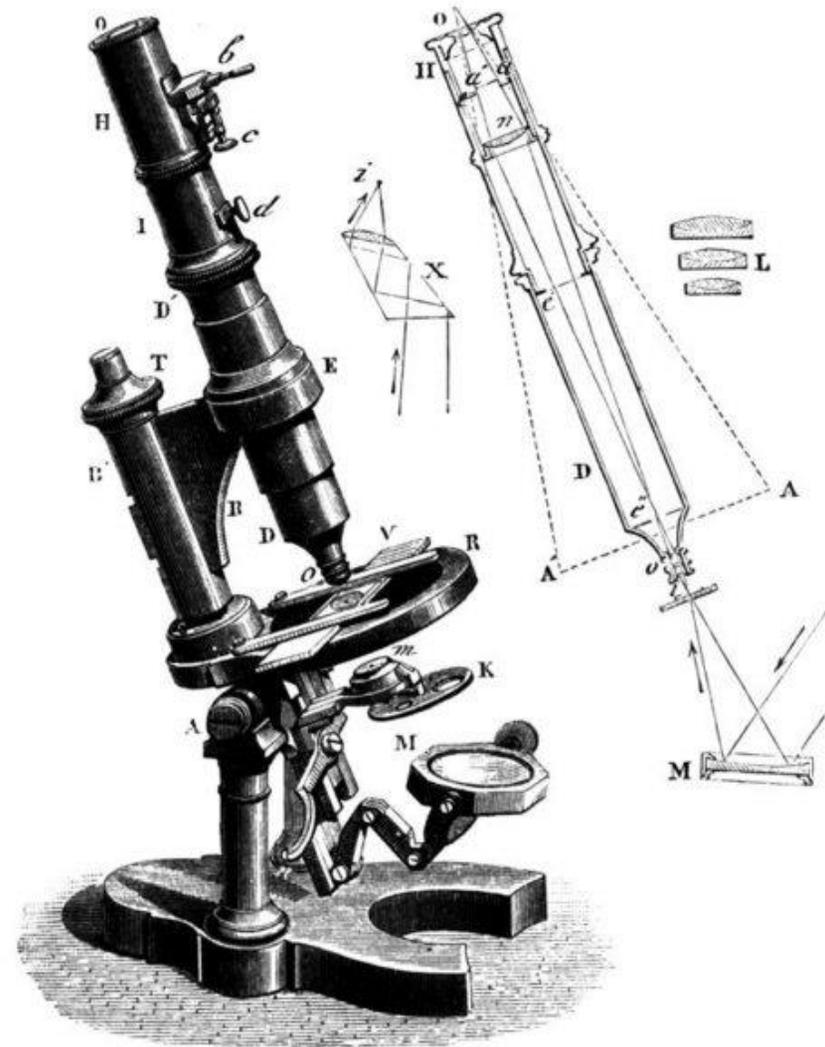
# 1. El microscopio: Tipos de microscopio

## Microscopio Óptico

La luz visible pasa a través de la muestra y de las lentes de vidrio por donde la luz es refractada e tal manera, que la imagen del espécimen es amplificada cuando se proyecta en el ojo.

## Microscopio Óptico Compuesto

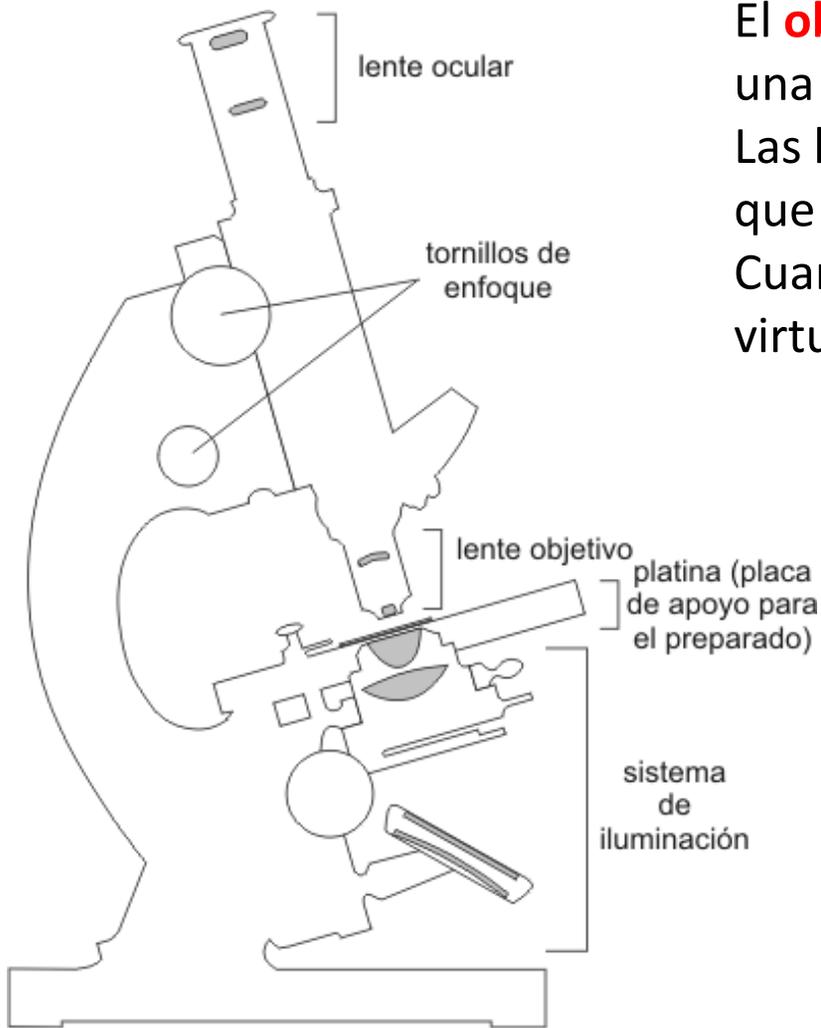
Es un microscopio óptico que tiene más de un lente.



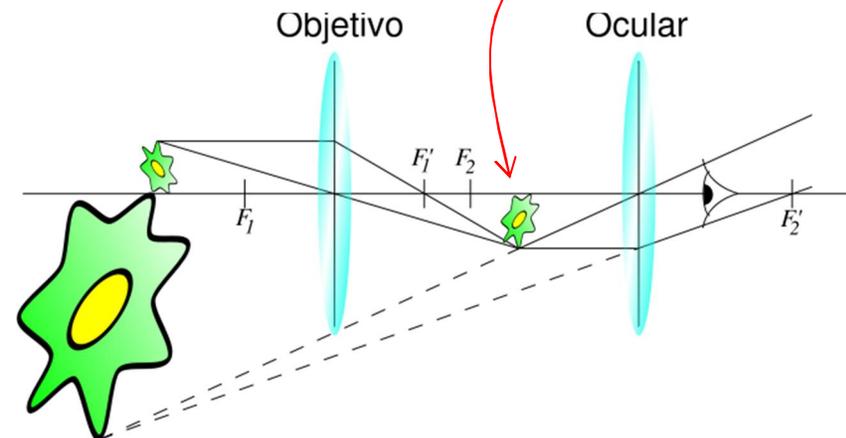
Traité Élémentaire de Physique por A. Ganot. 9 ed. Publicado en 1884 por Librairie Hachette et Cie. Par

## 1. El microscopio: Tipos de microscopio

El microscopio compuesto consiste en dos sistemas de lentes, el objetivo y el ocular, montados en extremos opuestos de un tubo cerrado.



El **objetivo** está compuesto de varias lentes que crean una imagen real aumentada del objeto examinado. Las lentes de los microscopios están dispuestas de forma que el objetivo se encuentre en el **punto focal del ocular**. Cuando se mira a través del ocular se ve una imagen virtual aumentada de la imagen real.



El aumento total del microscopio depende de las longitudes focales de los dos sistemas de lentes.

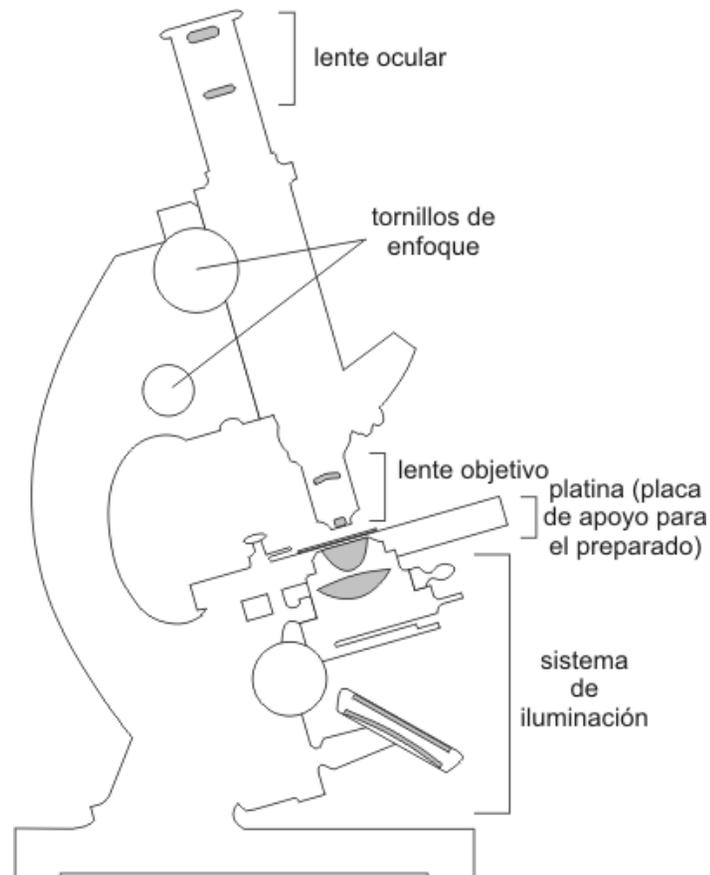
## 1. El microscopio: Tipos de microscopio

Está conformado por tres sistemas:

El sistema mecánico → una serie de piezas en las que van instaladas las lentes, que permiten el movimiento para el enfoque.

El sistema óptico → el conjunto de lentes.

El sistema de iluminación → las partes del microscopio que reflejan, transmiten y regulan la cantidad de luz.



**1. El microscopio:**  
**Tipos de microscopio**

Capta y amplia la imagen formada en el foco de la objetivas. En general los mas utilizados son los de 10X

**Lentes oculares**  
**(10x y 12x)**

cámara oscura unida al brazo; tiene el revolver con los objetivos en su parte inferior y los oculares en el extremo superior.

**Cabezal (tubo)**

coge los objetivos

**Brazo**

**Revolver**

Son colocados en la parte inferior del tubo en el revolver. Generan una imagen real, invertida y aumentada.

**Objetivos**  
**(4x, 10x, 40x y 100x)**

mueven la platina hacia arriba y hacia abajo, de forma rápida o lenta.

**Macrométrico**

Plataforma horizontal sobre el que se coloca la preparación.

**Platina**

**Fuente de iluminación**

lámpara halógena

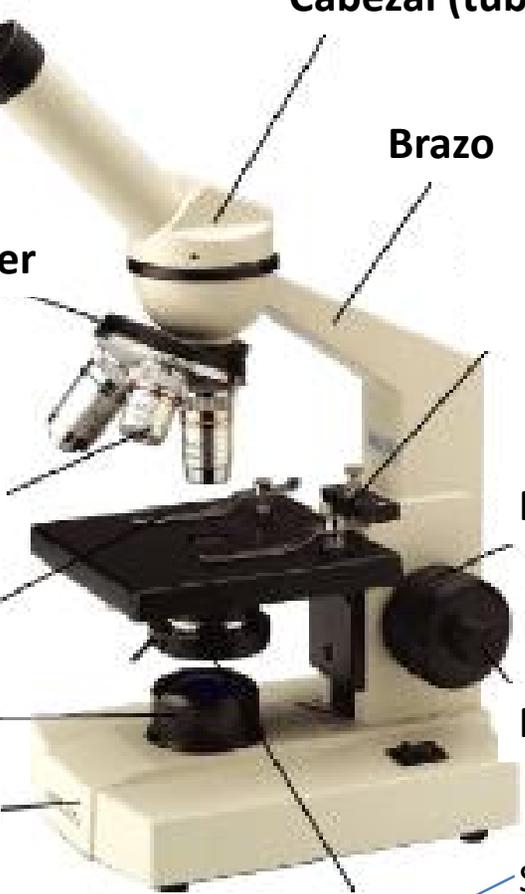
**Micrométrico**

**Base o pie**

**Condensado**  
**y**  
**diafragma**

Sistema de lentes que tiene la función de concentrar la luz generada por la fuente de iluminación hacia la preparación

Situado en el interior del condensador, funciona como una iris cuya función es limitar el haz de rayos que atraviesa el sistema de lentes eliminando los rayos demasiado desviados



# 1. El microscopio:

## Tipos de microscopio

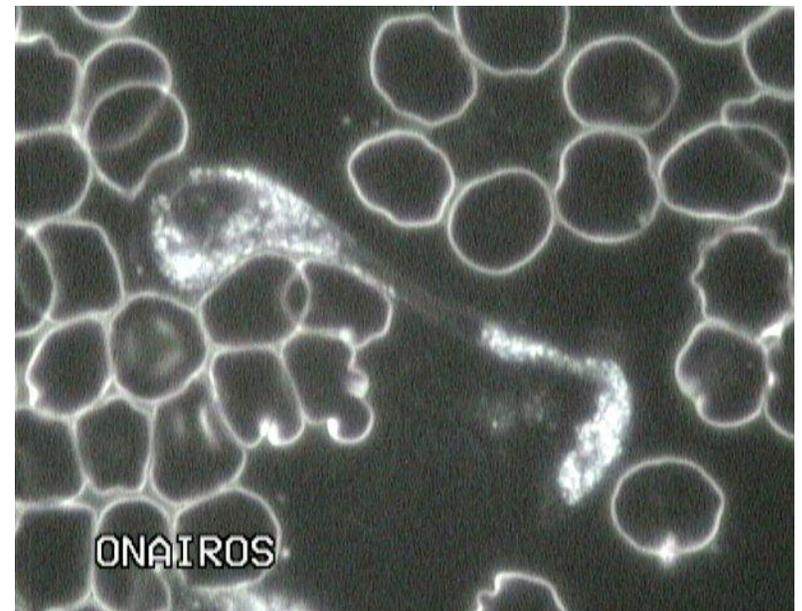
### *Microscopio Óptico de Campo Oscuro*

Se utiliza un fondo oscuro sobre el que se ven los objetos intensamente iluminados.

Se utiliza para analizar elementos biológicos transparentes y sin manchas, invisibles con iluminación normal.

Permite ver los microorganismos sin teñir, ver sus contornos y su movilidad

Utiliza una luz muy intensa en forma de un cono hueco concentrado sobre el espécimen. El campo de visión del objetivo se encuentra en la zona hueca del cono de luz y sólo recoge la luz que se refleja en el objeto. Por ello las porciones claras del espécimen aparecen como un fondo oscuro y los objetos minúsculos que se están analizando aparecen como una luz brillante sobre el fondo.

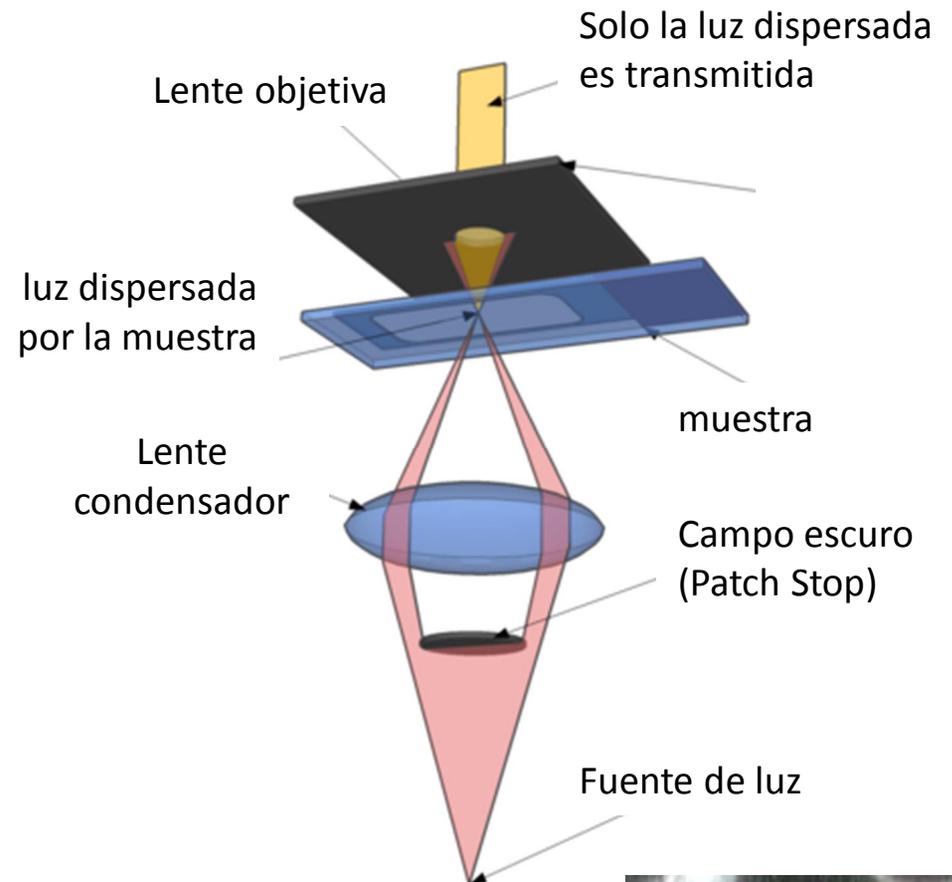


# 1. El microscopio: Tipos de microscopio

## Microscopio Óptico de Campo Oscuro

- (1) Un disco especial (Patch Stop) bloquea a luz creando un cono de luz formando un anillo de luz;
- (2) Las lentes condensadores concentran la luz sobre la muestra;
- (3) La luz pasa por la muestra: la mayoría es directamente transmitida, pero algunos fotones son **dispersados** de la muestra;
- (4) A luz **dispersada** entra en la objetiva; (la luz transmitida pasa directamente sin ser desviada, es bloqueada y no interacciona con la lente objetiva).

Apenas la luz **dispersada** va producir la imagen, (la luz transmitida es perdida)



## 1. El microscopio: Tipos de microscopio

### Microscopio de Contraste de Fase

Se usa principalmente para aumentar el contraste entre las partes claras y oscuras de las células sin colorear.

Es ideal para especímenes delgados, o células aisladas.



El **microscopio de fase** ilumina el espécimen con un cono hueco de luz, como en el microscopio en campo oscuro. Sin embargo, en el microscopio de fase el cono de luz es más estrecho y entra en el campo de visión del objetivo, que contiene un dispositivo en forma de anillo que reduce la intensidad de la luz y provoca un ***cambio de fase de un cuarto de la longitud de onda***. Este tipo de iluminación provoca variaciones minúsculas en el índice de refracción de un ***especimen transparente***, haciéndolo visible.

1. El microscopio:  
Tipos de microscopio

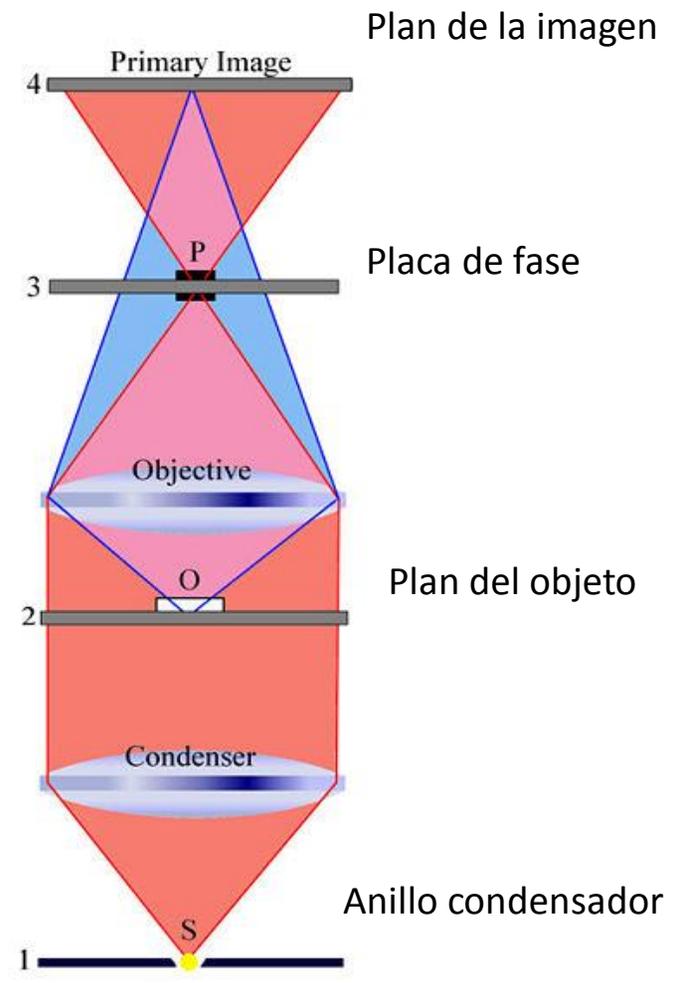
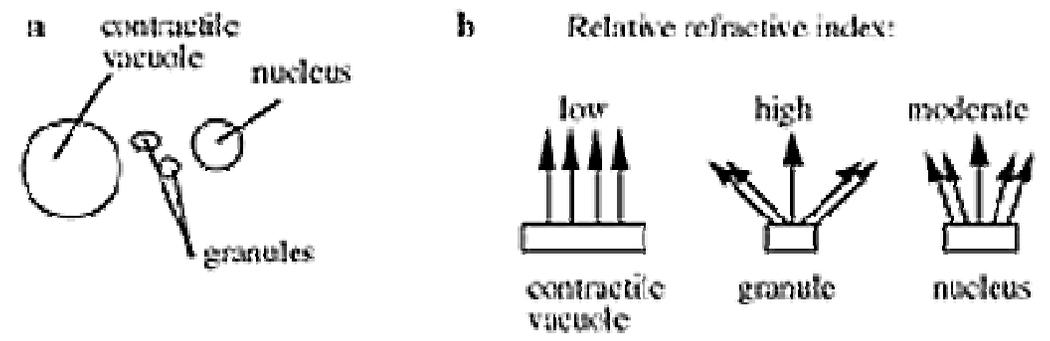
Microscopio de Contraste de Fase

(a) Los orgánulos son casi invisibles en el microscopio de campo claro, pero tienen diferentes índices de refracción,

(b) la luz es más desviada en los objetos con un alto índice de refracción;



Los dos rayos de luz son refractado de tal manera que en la salida del condensador salen como rayos paralelos, entran en contacto con la muestra, como rayos paralelos.

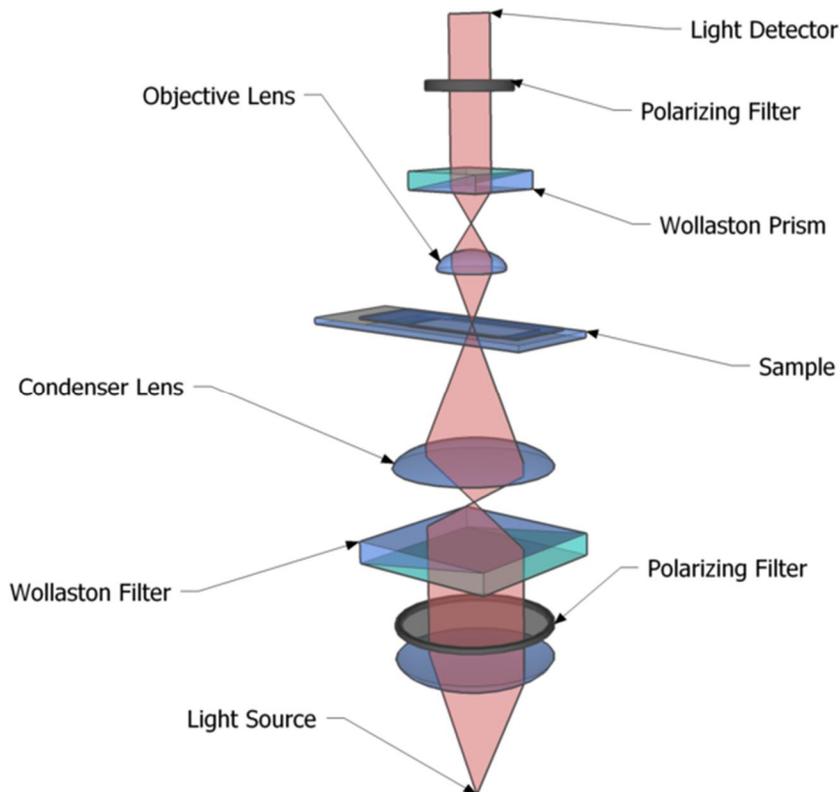


# 1. El microscopio: Tipos de microscopio

## Microscopio Diferencial de Contraste de Interferencia (DIC)

Utiliza dos rayos de luz polarizada y las imágenes combinadas aparecen como si la célula estuviera proyectando sombras hacia un lado.

Se usa cuando el espécimen es muy grueso para usar contraste de fases normal se usa luz polarizada



# 1. El microscopio: Tipos de microscopio

## Microscopio Diferencial de Contraste de Interferencia (DIC)

La **luz no polarizada** entra en el microscopio

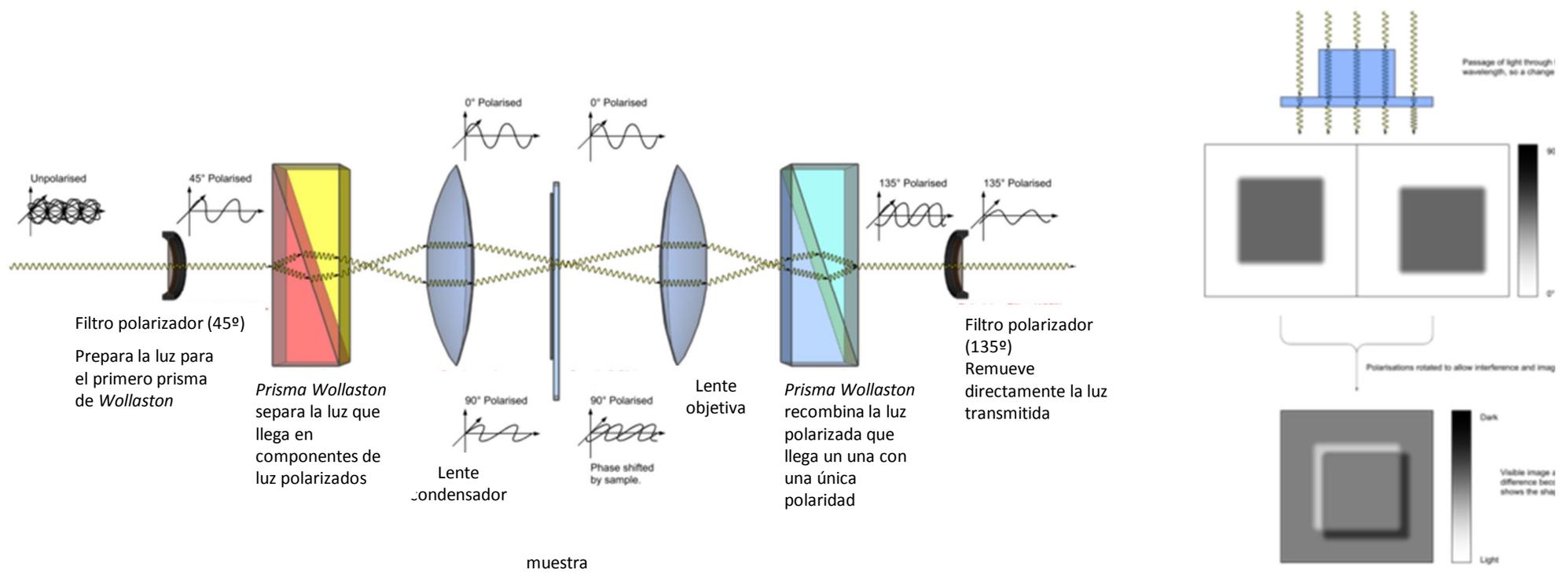
El pasa por un polarizador (Nomarski-modified Wollaston prism )

Los rayos son focalizados por el condensador para atravesar la muestra;

Ellos van a interactuar en puntos diferentes (adyacentes) de la muestra, que poseen diferentes espesores, creando un cambio de fase de un rayo en relación al otro.

Los rayos atraviesan una segunda lente objetiva convergente y un segundo prisma

Este combina los dos rayos creando una imagen de interferencia, con claros y oscuros.

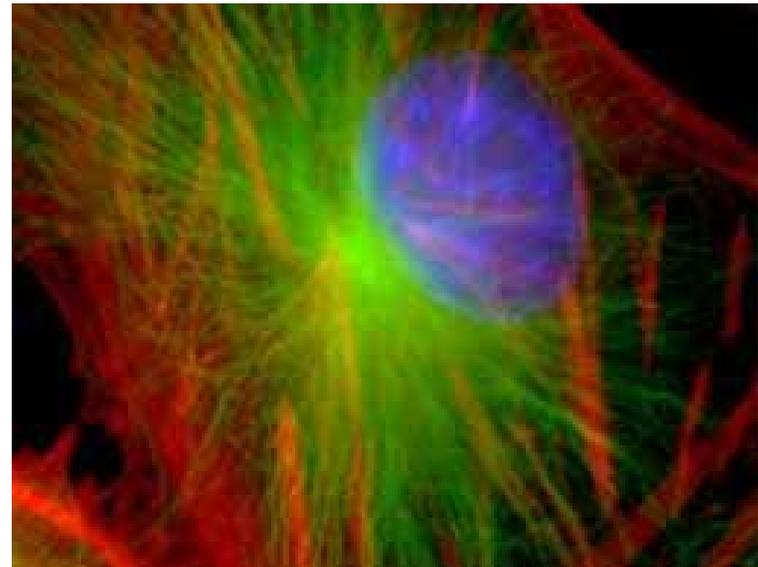
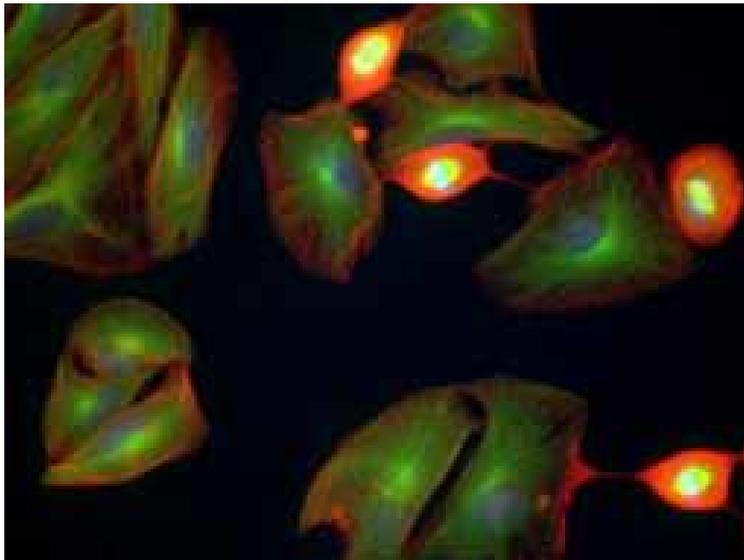


## 1. El microscopio: Tipos de microscopio

### *Microscopio de Fluorescencia*

Consta de una fuente de luz muy potente y un filtro de excitación que sólo deja pasar la radiación UV deseada. Ésta, tras interaccionar con la muestra, es de nuevo filtrada, dejando pasar solamente la luz fluorescente hacia los oculares.

Una sustancia natural en las células o un colorante fluorescente es aplicado al corte. Este es estimulado por un haz de luz, emitiendo parte de la energía absorbida como rayas luminosas, es decir, produce una fluorescencia.



# 1. El microscopio: Tipos de microscopio

## Microscopio de Fluorescencia

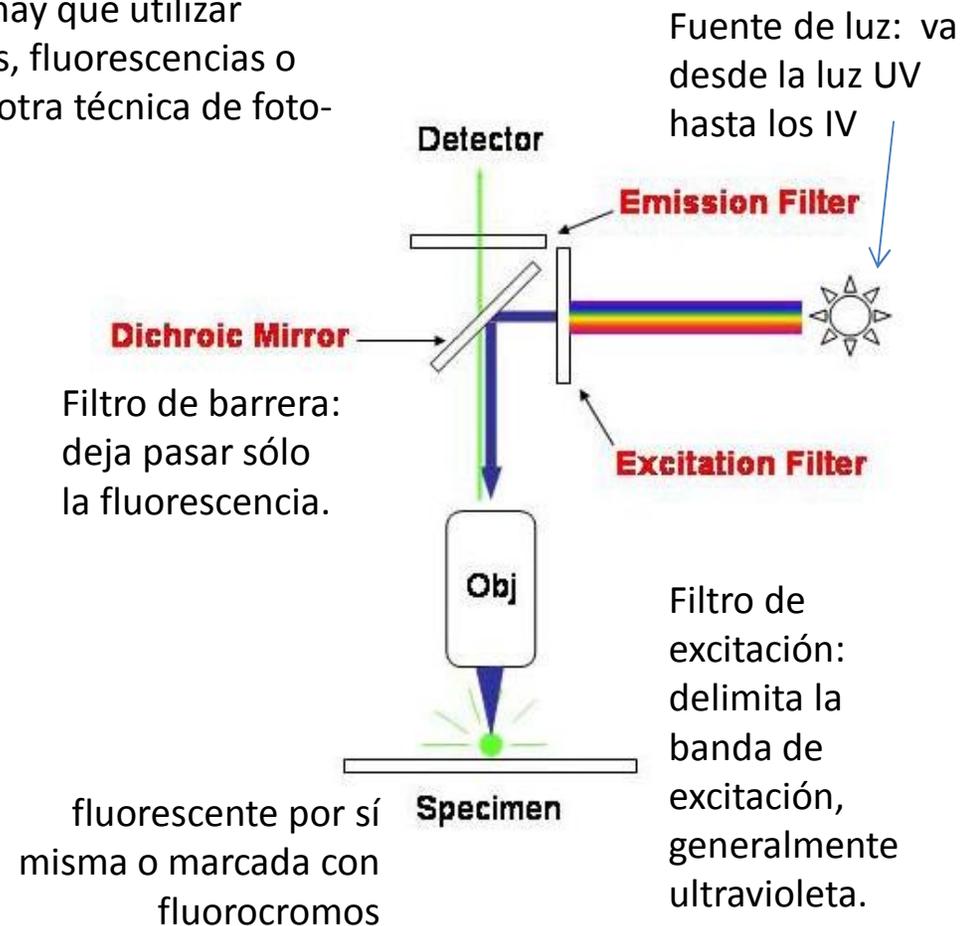
La muestra es iluminado con la luz de una determinada longitud de onda (la que es absorbida por el fluorocromos utilizado ), provocando la emisión de longitudes de onda más largas de luz (de un color diferente que absorbe la luz).

Se utilizan filtros para separar la luz.

Componentes típicos:  
la fuente de luz (lámpara de vapor de mercurio ),  
filtro de excitación,  
espejo dicroicos,  
filtro de emisión

Los filtros y el espejo dicroico son organizados de modo a obtener un espectro de excitación, y formar la imagen.

La imagen es invisible al ojo humano, hay que utilizar fotografías, fluorescencias o cualquier otra técnica de foto-emisión.



# 1. El microscopio: Tipos de microscopio

## Microscopio Electrónico

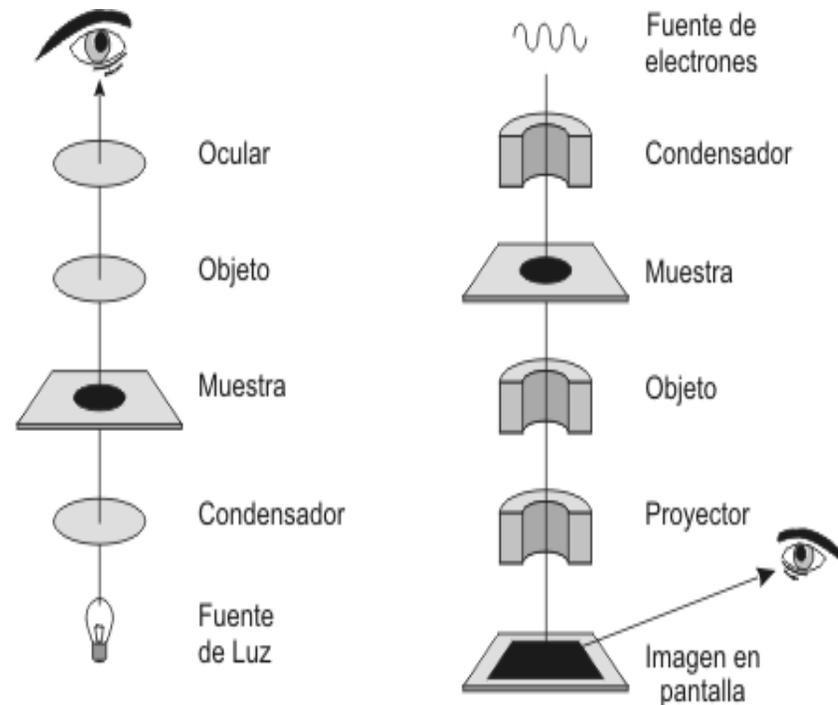
Utiliza electrones (longitud de onda muy chica) en lugar de fotones para formar imágenes.

Capacidad de aumento muy superior a los microscopios convencionales

Hasta 500.000 aumentos comparados X 1000 de los MO

Funciona con un haz de electrones generados por un cañón electrónico, acelerados por un alto voltaje y focalizados por medio de “lentes magnéticas”, que forman una imagen sobre una placa fotográfica

Los ME sólo se pueden ver en blanco y negro

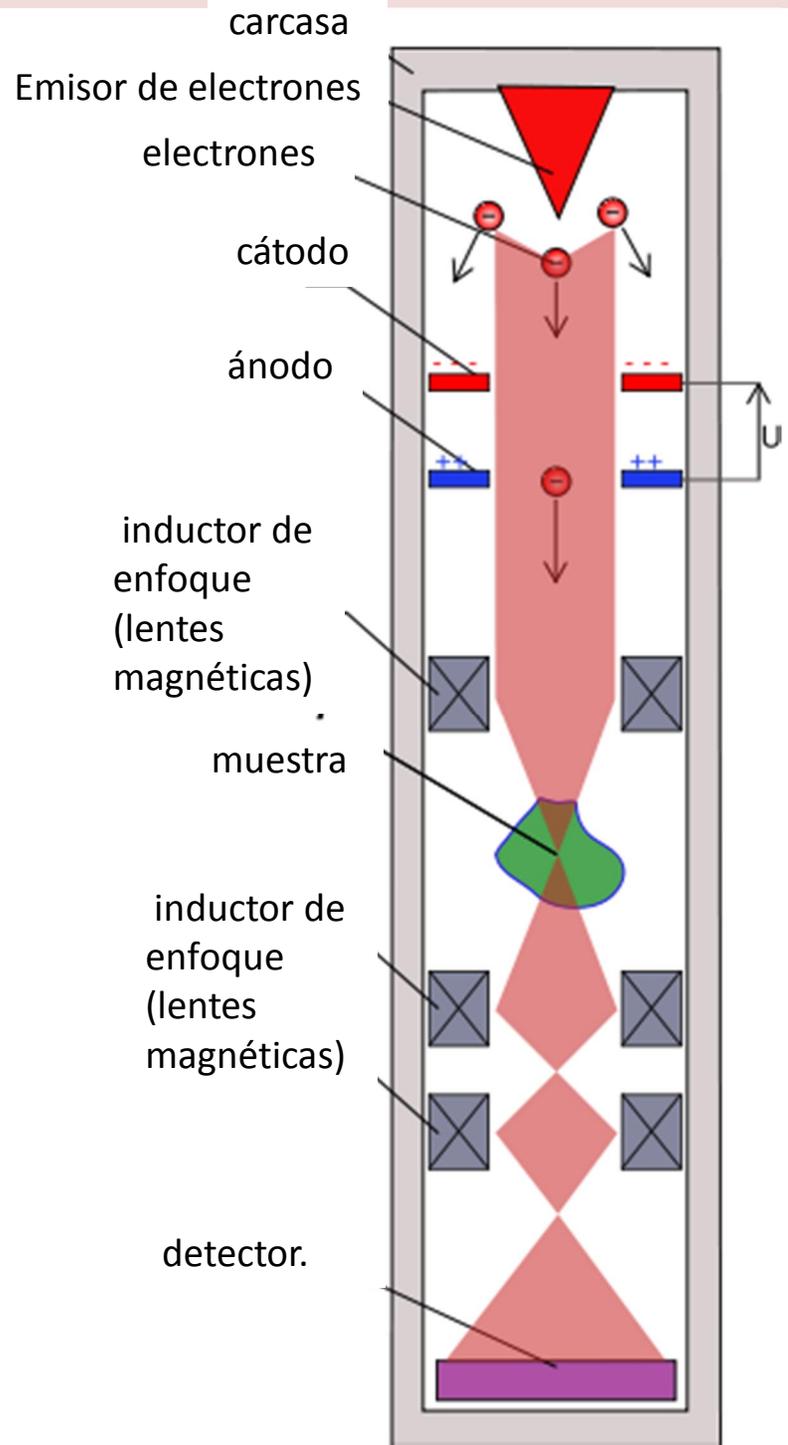


1. El microscopio:  
Tipos de microscopio

*Microscopio Electrónico de Transmisión*

Un haz de electrones es dirigido hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra.

Para utilizar un microscopio electrónico de transmisión debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de angstroms.



# 1. El microscopio: Tipos de microscopio

## *Microscopio Electrónico de Barrido*

En el microscopio electrónico de barrido la muestra es recubierta con una capa de metal delgado, y es barrida con electrones enviados desde un cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones.

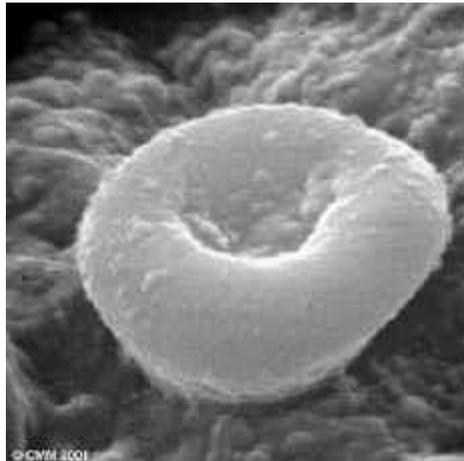
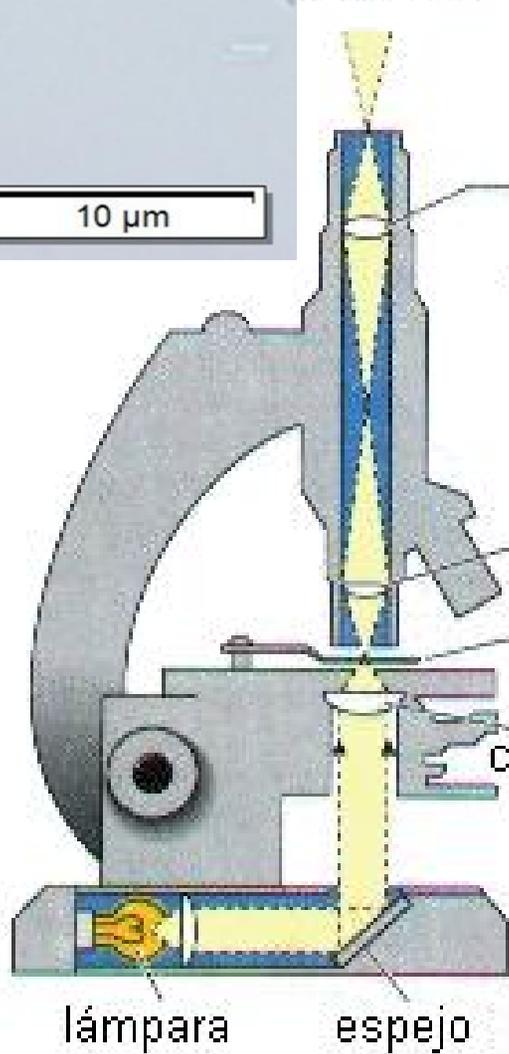
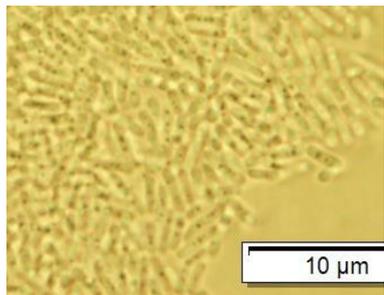


Imagen no olho

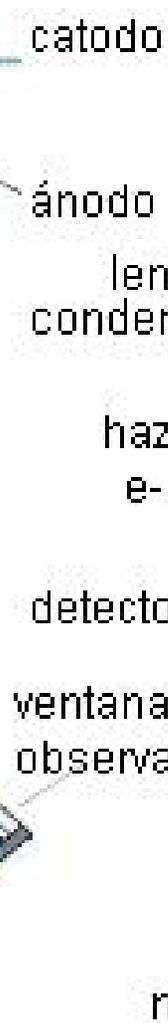
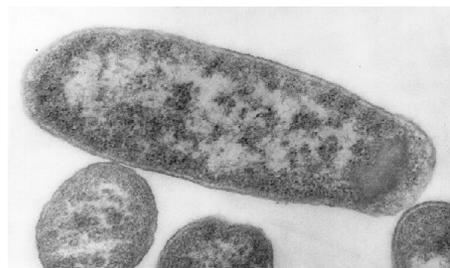
10  $\mu\text{m}$



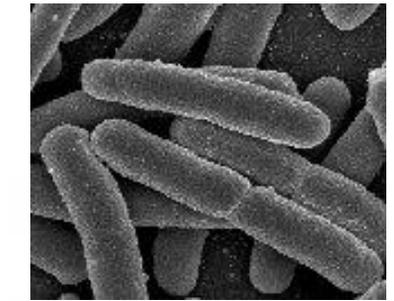
**MICROSCOPIO ÓPTICO**



**MICROSCOPIO ELEC. TRANSMISION**



**MICROSCOPIO ELEC. BARRIDO**



amplificador electrónico

ventana de observación

detector e-

haz de e-

lentes condensador

ánodo

catodo

ánodo

imagen

muestra

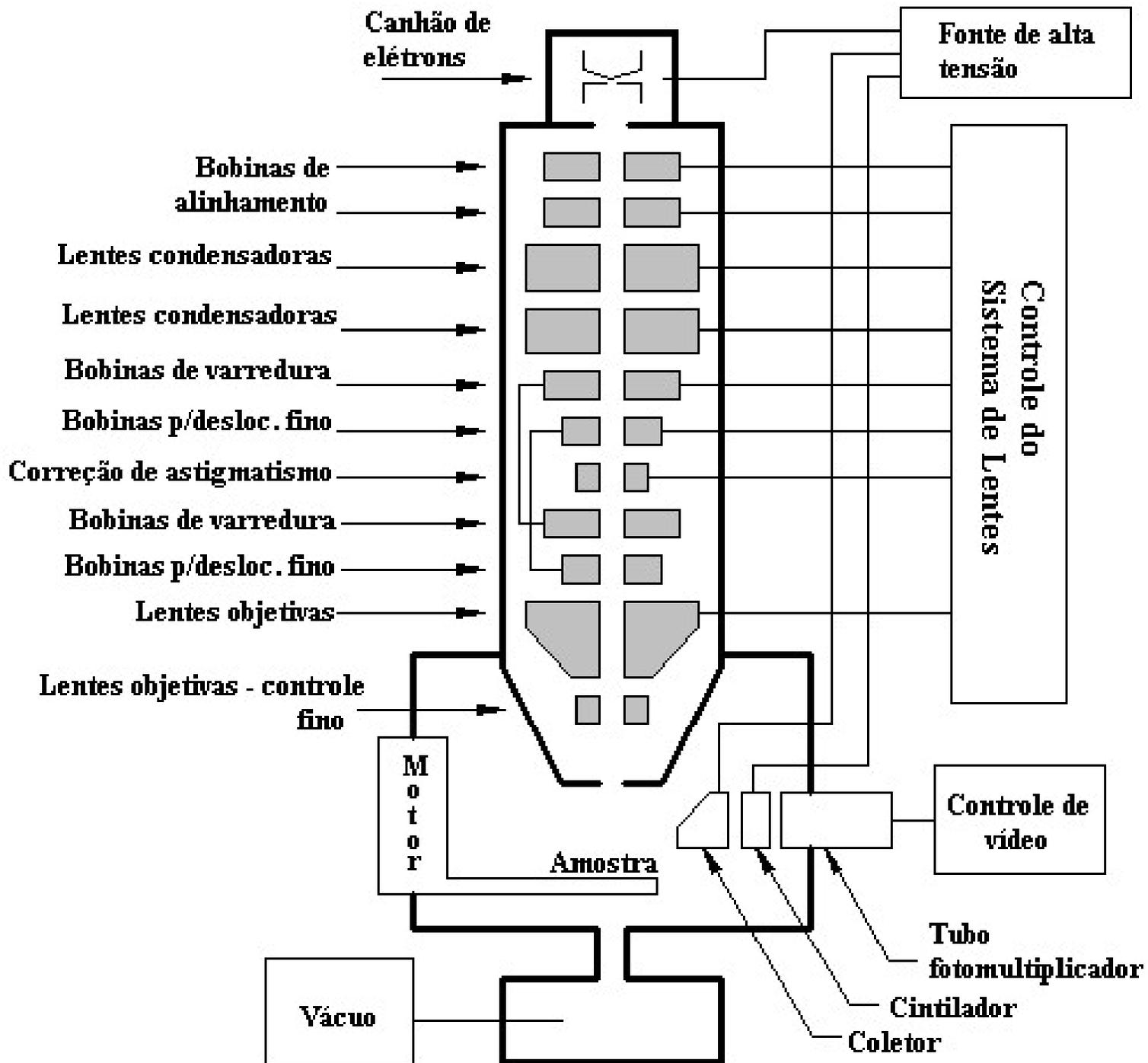
imagen

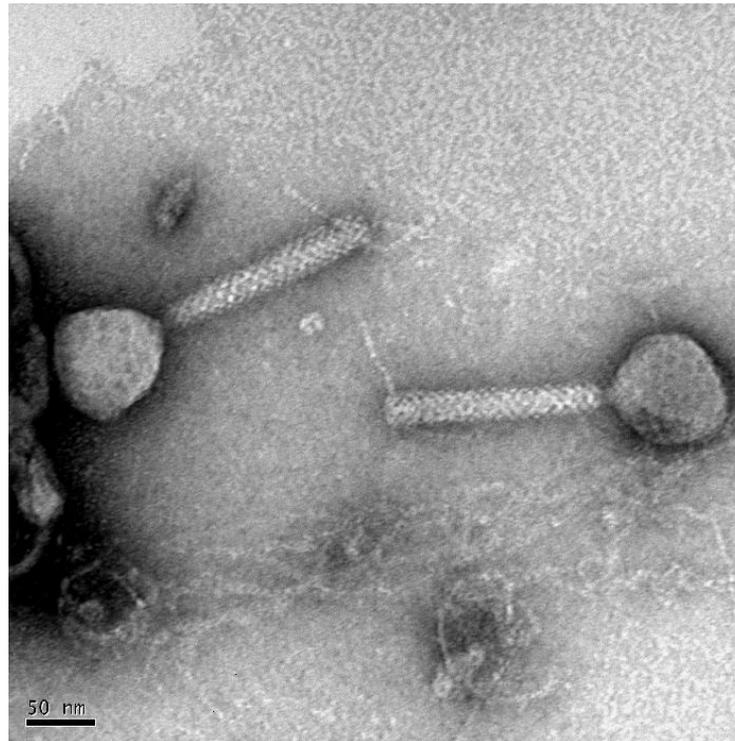
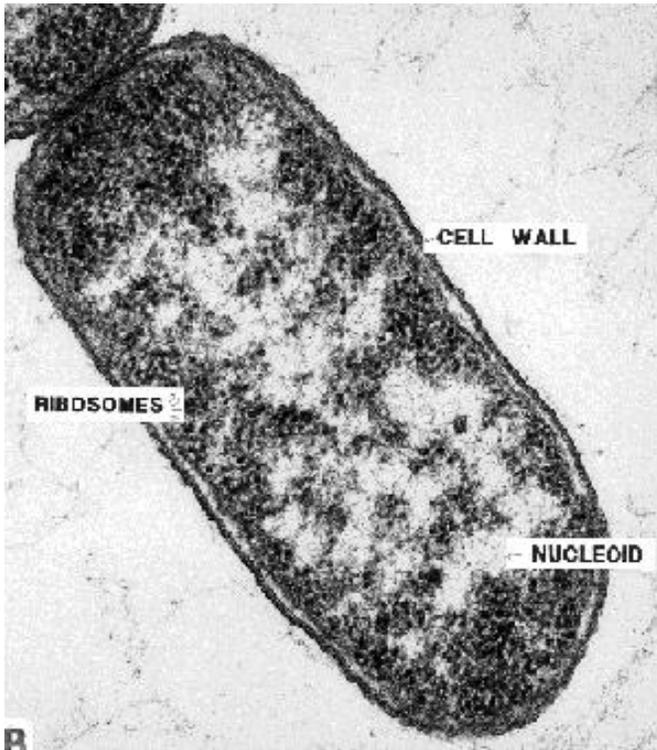
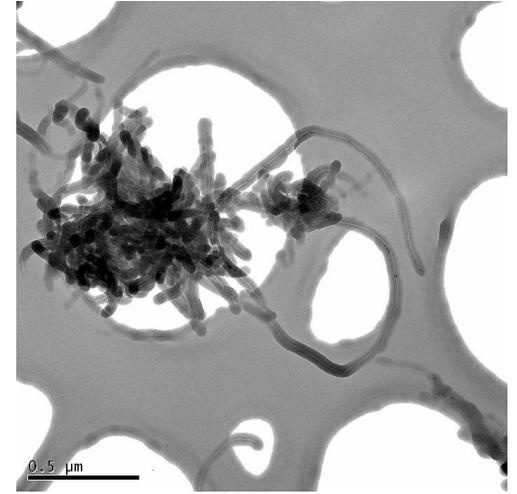
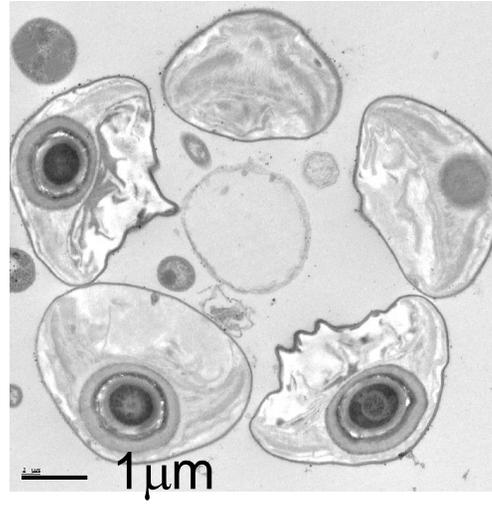
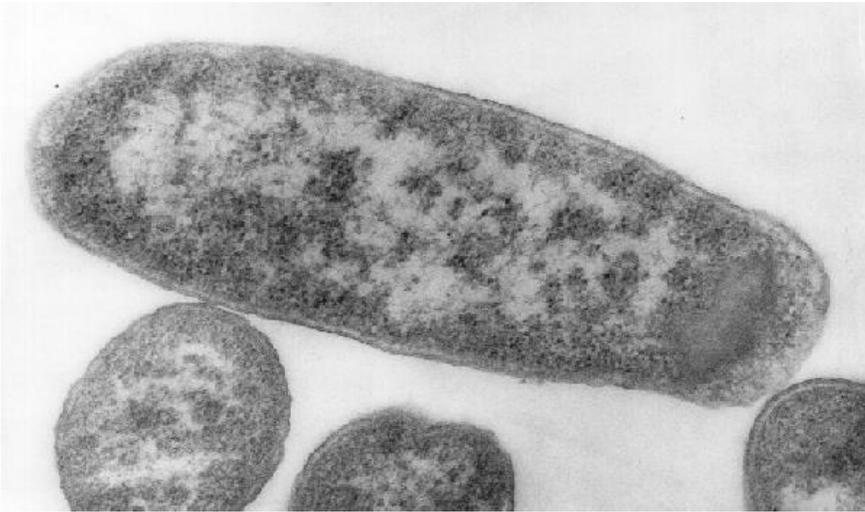
espejo

lámpara









0.5 μm

50 nm

