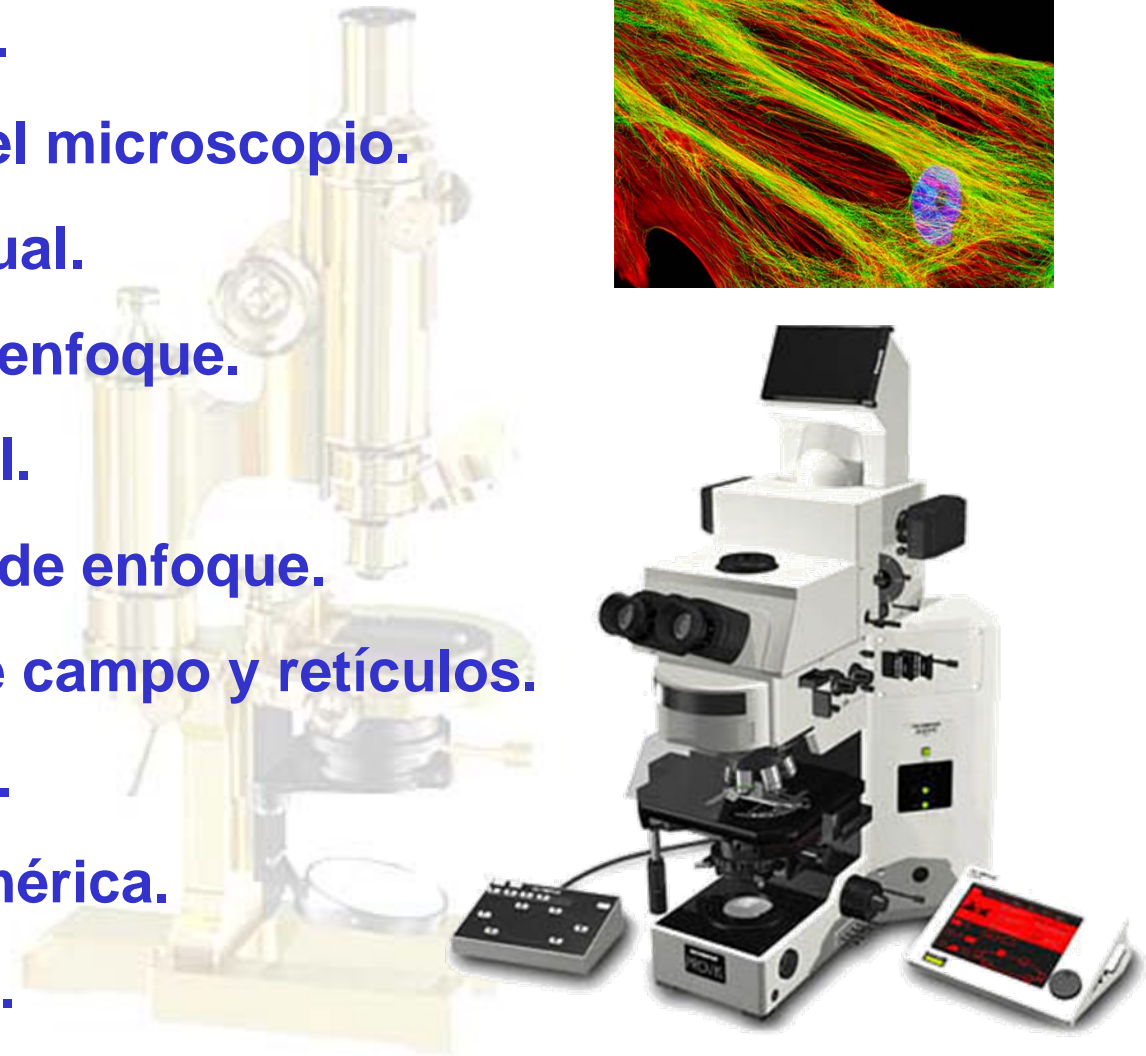
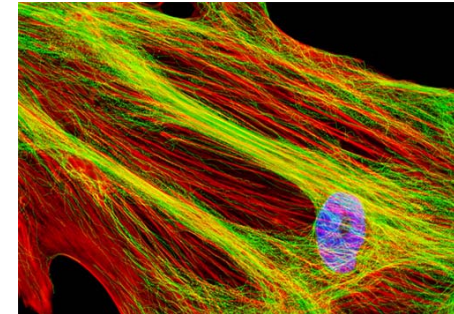


## TEMA 6.- EL MICROSCOPIO

- Introducción.
- Estructura del microscopio.
- Aumento visual.
- Distancia de enfoque.
- Campo visual.
- Profundidad de enfoque.
- Diafragma de campo y retículos.
- Los oculares.
- Apertura numérica.
- Luminosidad.
- Poder separador.



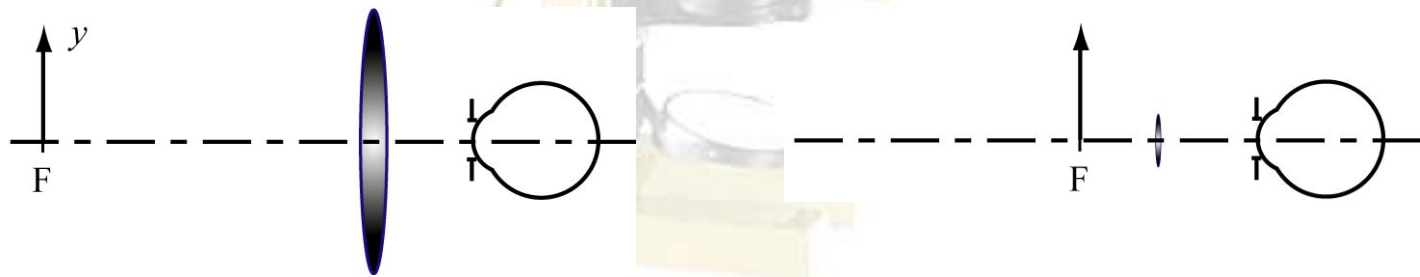


# EL MICROSCOPIO

## 6.1.- Introducción

**Microscopio:** Instrumento óptico subjetivo para la observación de objetos cercanos constituidos por detalles cuyas dimensiones se sitúan por debajo del mínimo separable por el ojo.

En principio, una lupa de gran aumento visual entraría en esta definición, sin embargo, en la práctica el valor del aumento de la lupa está limitado, ya que para valores del aumento superiores a  $\Gamma=20$  la lente sería demasiado pequeña.

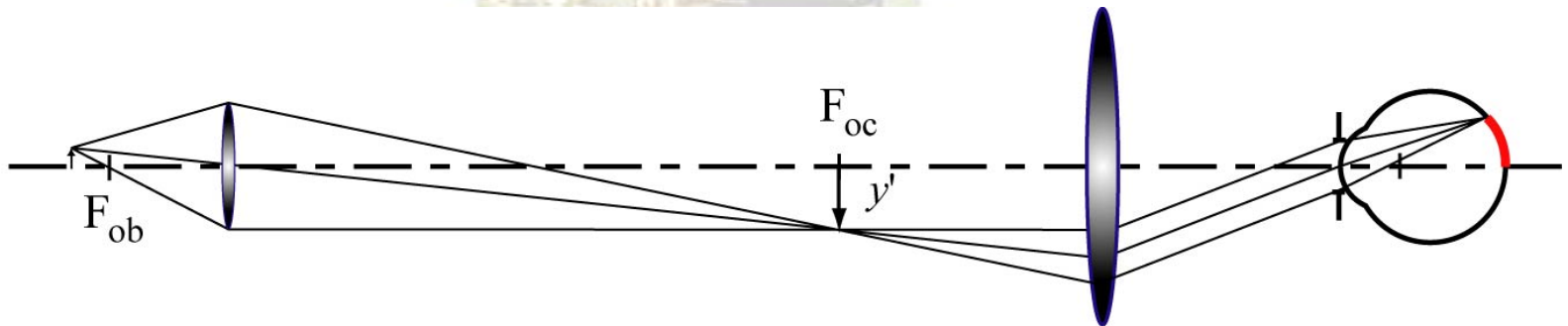
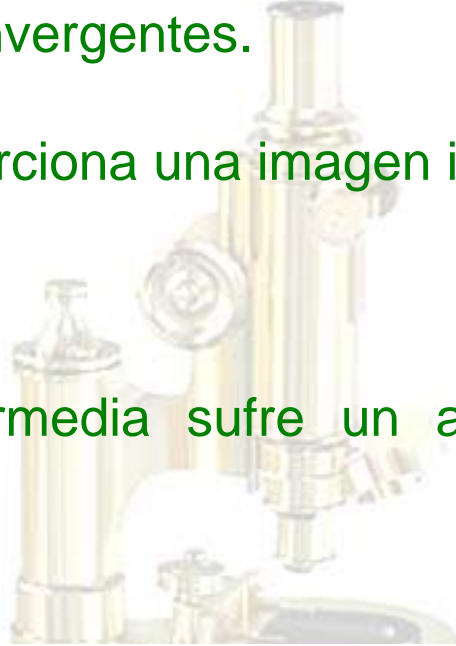


¿Qué solución aporta el Microscopio?





- El microscopio proporciona una imagen final muy aumentada tras un proceso de doble etapa, mediante el acoplamiento de dos elementos convergentes.
- El objetivo proporciona una imagen intermedia real e invertida.
- La imagen intermedia sufre un aumento adicional bajo la acción del ocular.



- El acoplamiento del objetivo y el ocular proporciona un aumento máximo en torno a 2.000

## 6.2.- Estructura del microscopio

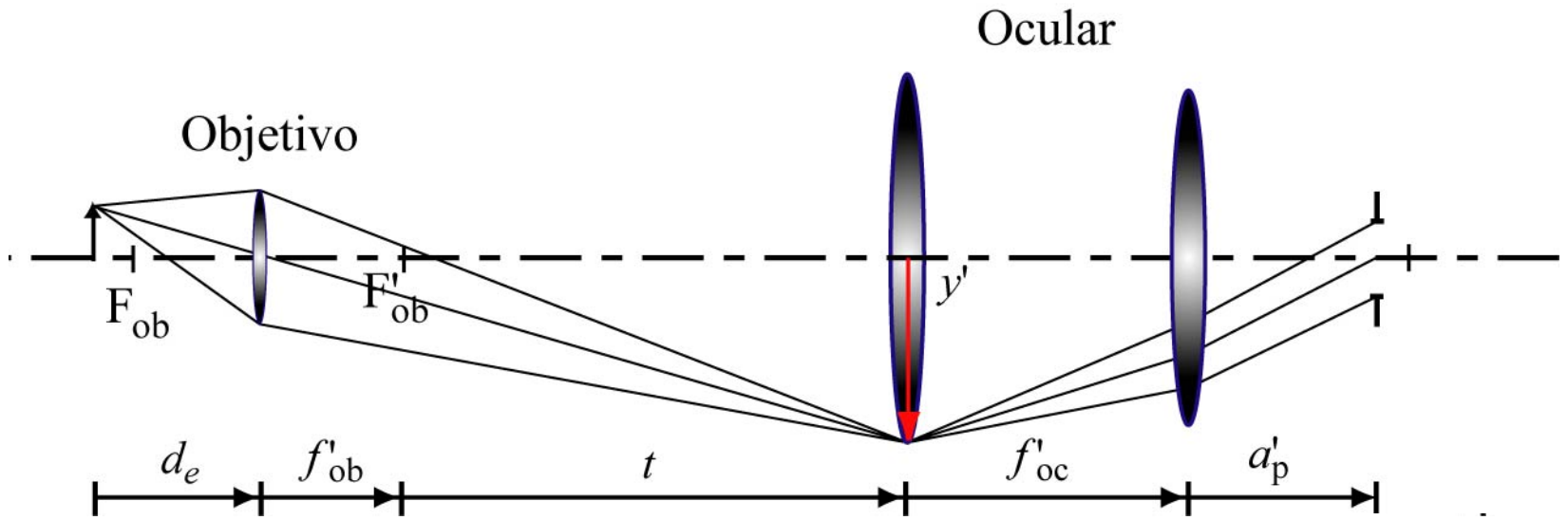
- **Objetivo:** En la práctica, los objetivos son siempre sistemas convergentes muy complejos.

- **Ocular:** En general, el ocular está constituido por:

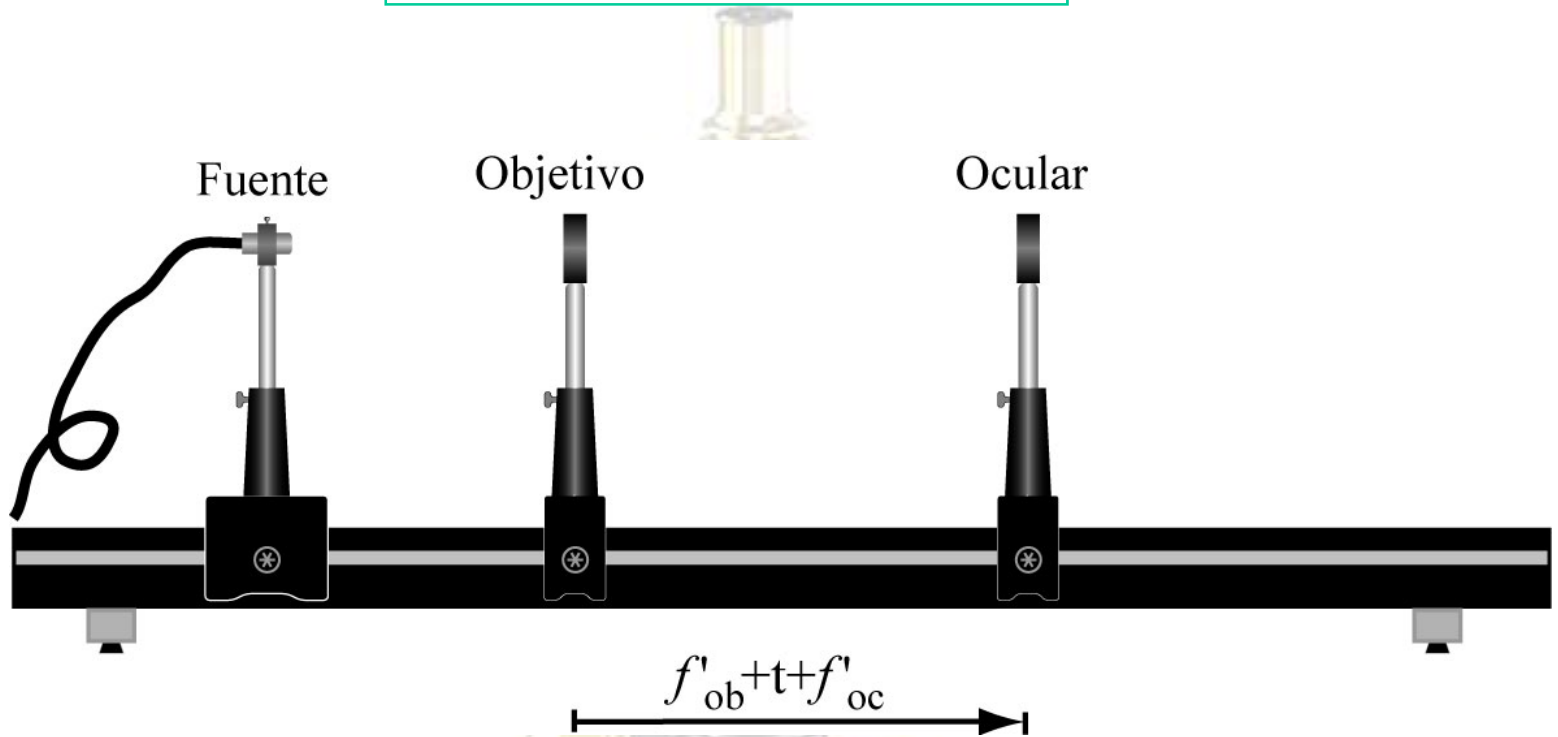
*Lente de campo*

*Lente de ojo*

- A la distancia,  $t$ , entre el foco imagen del objetivo y el foco objeto del ocular se le denomina **intervalo óptico o longitud óptica del tubo**.



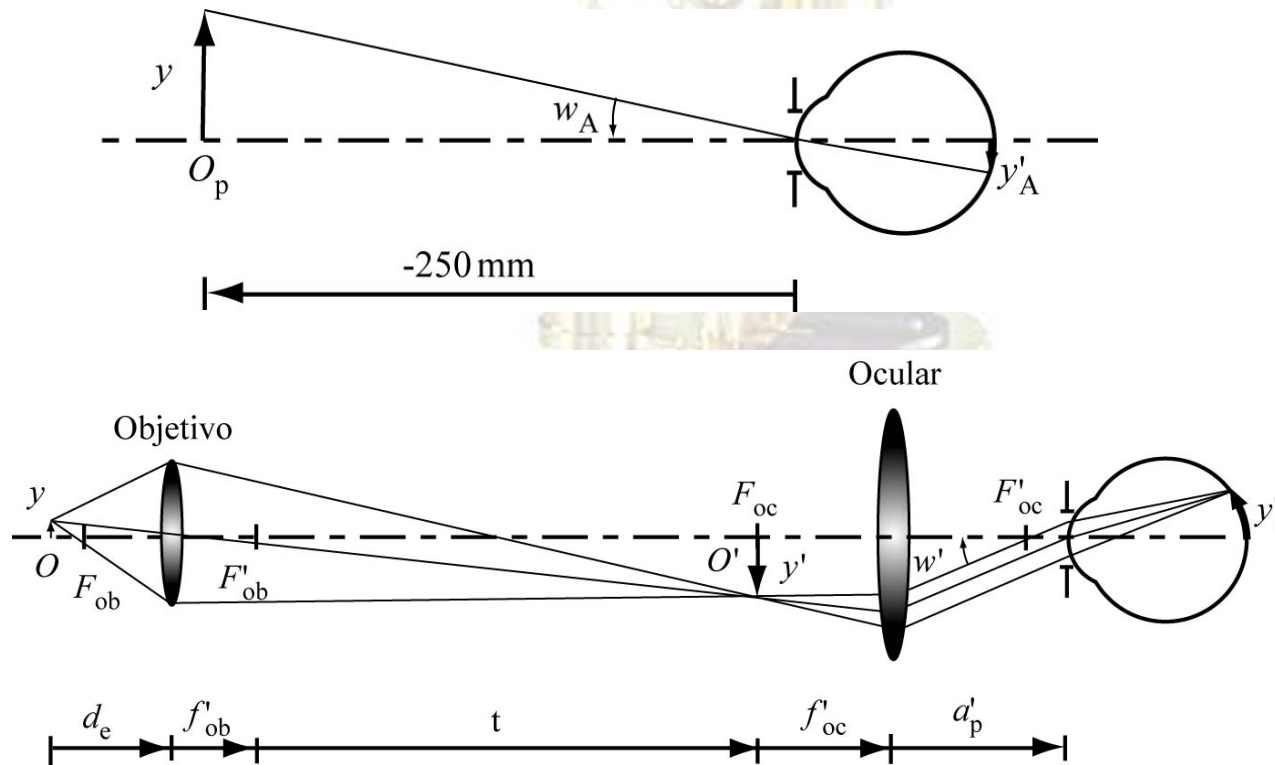
# Práctica de laboratorio



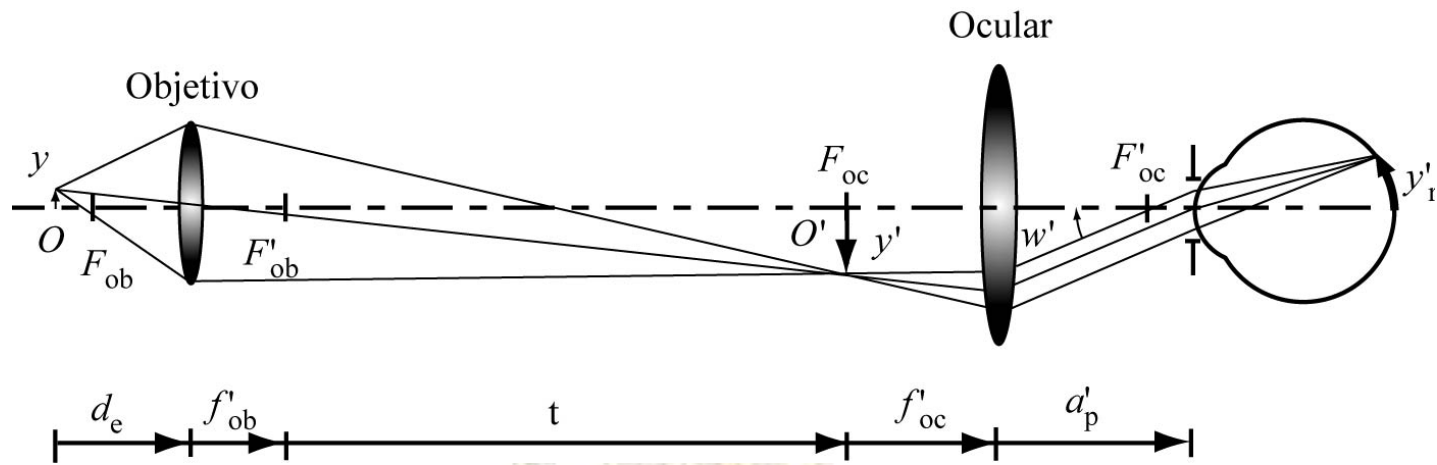
## Construcción del Microscopio

## 6.3.- Aumento visual

Al igual que en el caso de la Lupa, se define el **aumento normal** del microscopio como el cociente entre el tamaño angular aparente,  $w'$ , de la imagen y el tamaño angular,  $w_A$ , que tendría el objeto en el caso de estar situado a  $-250\text{mm}$  del observador.

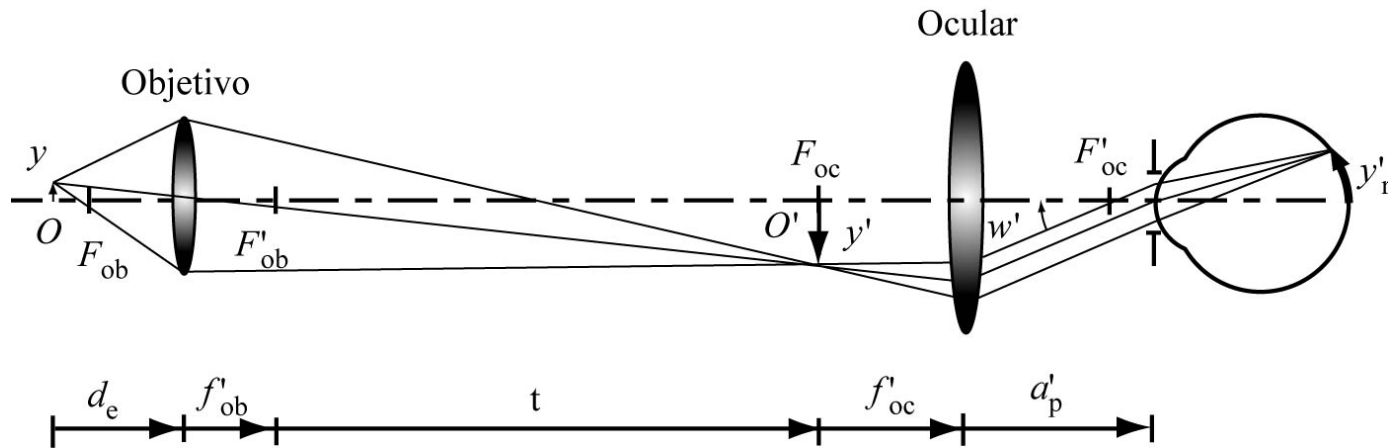


$$\Gamma = \frac{\tan w'}{\tan w_A}$$



$$\Gamma = \frac{\tan w'}{\tan w_A} = \frac{y' \cdot 0.25}{y \cdot f'_{oc}} = \beta_{ob} \Gamma_{oc}$$

El Microscopio proporciona valores altos del aumento visual en un proceso de doble etapa:



$$\Gamma = \beta_{oc} \Gamma_{oc} = 0.25 \frac{-t}{f'_{ob} f'_{oc}} = \frac{0.25(m)}{f'_m(m)} = \frac{250(mm)}{f'_m(mm)}$$

- El Microscopio se comporta como una Lupa de focal  $f'_m$
- El aumento visual del Microscopio es negativo





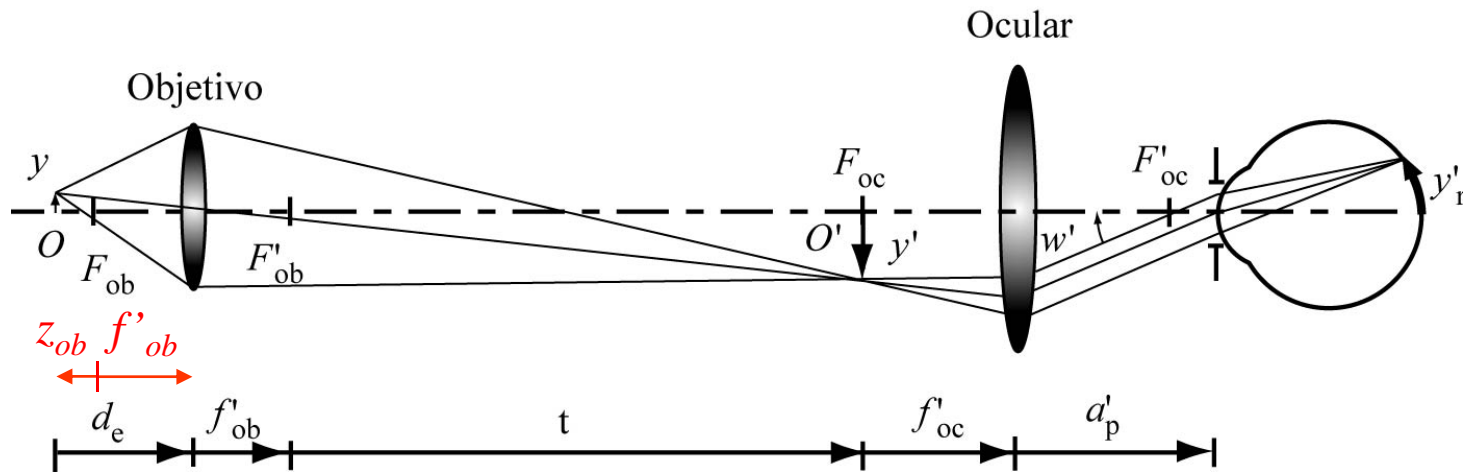
- Desde un punto de vista comercial el aumento del Microscopio se suele especificar de la forma

$$m \times n, \text{ donde } m = |\beta_{\text{ob}}| \text{ y } n = \Gamma_{\text{oc}}$$

- Objetivo  $m \times$  (entre 10 y 100)
  - Ocular  $\times n$  (máximo 20)
- $\Gamma = 2000$  (máximo)
- Los objetivos se diseñan (aumento y corrección de aberraciones) para una determinada *longitud óptica* y, por tanto, no es conveniente utilizarlos en microscopios con diferente valor de  $t$ .

## 6.4.- Distancia de enfoque

- La distancia de enfoque o distancia de trabajo,  $d_e$ , es la distancia desde el plano objeto hasta el vértice de la primera superficie del objetivo.
- Para el caso ideal de un objetivo constituido por una lente delgada



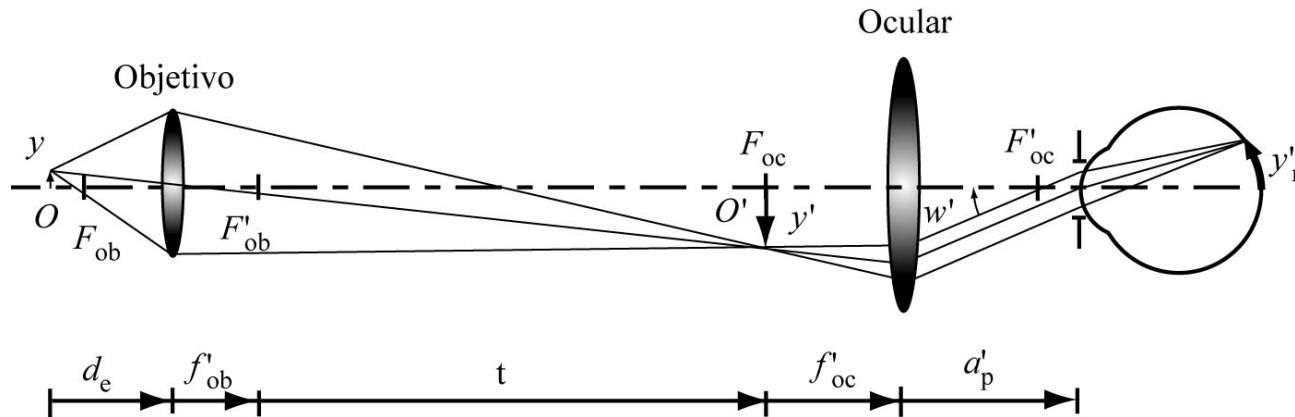
$$d_e = f'_ob + \frac{f'_ob}{|\beta_{ob}|}$$

## 6.5.- Campo visual

- Porción del objeto que es visible a través del Microscopio.

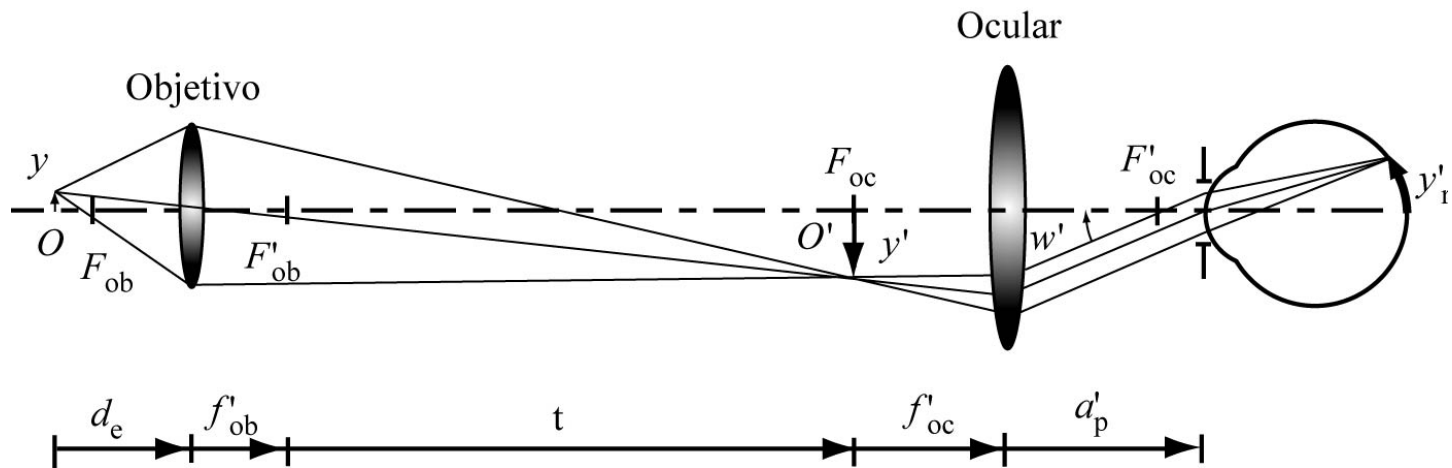
Cálculo del campo de iluminación media en el espacio óptico imagen:

- El ocular y la pupila del ojo están en el espacio imagen.
- Hay que calcular la posición del conjugado del objetivo en el espacio imagen.
- La imagen final proporcionada por el microscopio está en el infinito.
- En los microscopios la montura del objetivo actúa siempre como Diafragma de Apertura (y Pupila de Entrada) y, por tanto, su conjugado en el espacio imagen es la Pupila de Salida.



## 6.5.- Campo visual

### Posición y tamaño de la Pupila de Salida del Microscopio



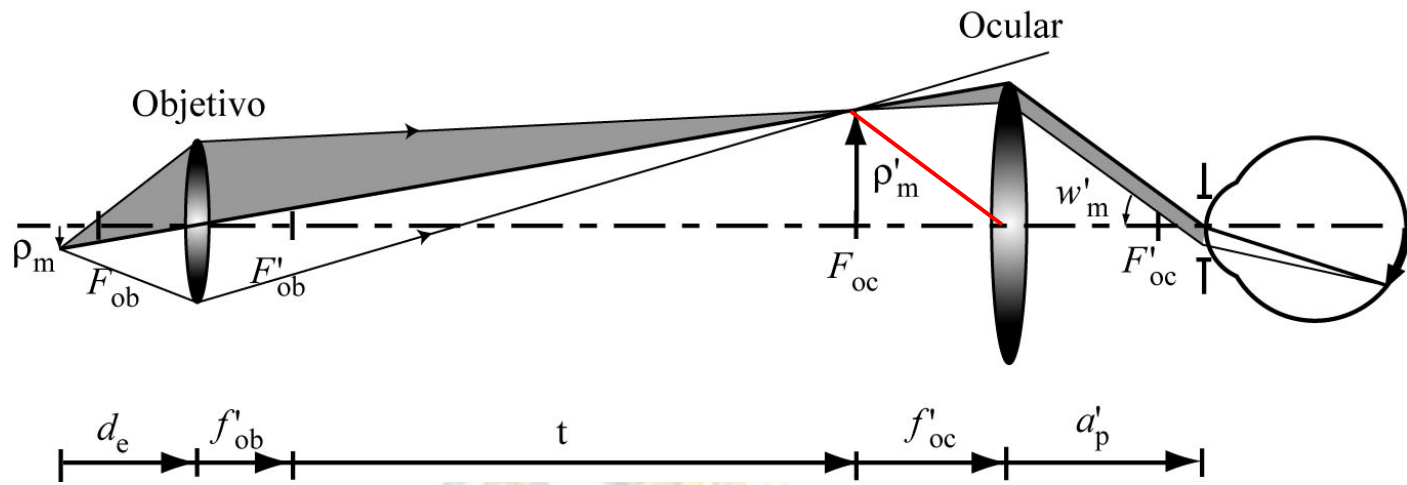
$$a'_p = f'_{oc} + z'_p$$

$$a'_p = f'_{oc} + \frac{f'^2_{oc}}{f'_{ob} + t}$$

$$\phi_{PS} = |\beta_p| \phi_{ob} = \frac{f'_{oc}}{f'_{ob} + t} \phi_{ob}$$

Emergencia pupilar

Para una observación óptima la pupila del ojo ha de situarse sobre la Pupila de Salida del Microscopio



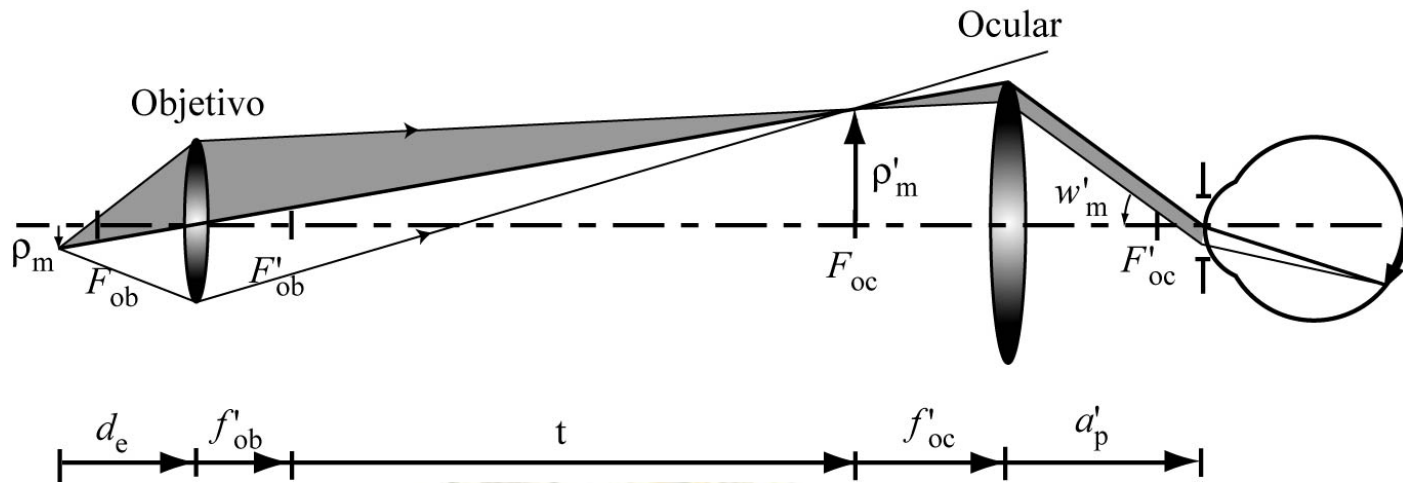
## Cálculo del campo de iluminación media en el espacio óptico imagen

El semicampo imagen de iluminación media es el ángulo subtendido por la montura del ocular desde el centro de la pupila del ojo

$$\tan w'_m = \frac{\phi_{oc}}{2a'_p}$$

Campo de iluminación media en el espacio óptico intermedio

$$2\rho'_m = f'_{oc} \frac{\phi_{oc}}{a'_p}$$



Campo de iluminación media en el espacio óptico intermedio

$$2\rho'_m = f'_{oc} \frac{\phi_{oc}}{a'_p}$$

Campo de iluminación media en el espacio objeto (Campo visual)

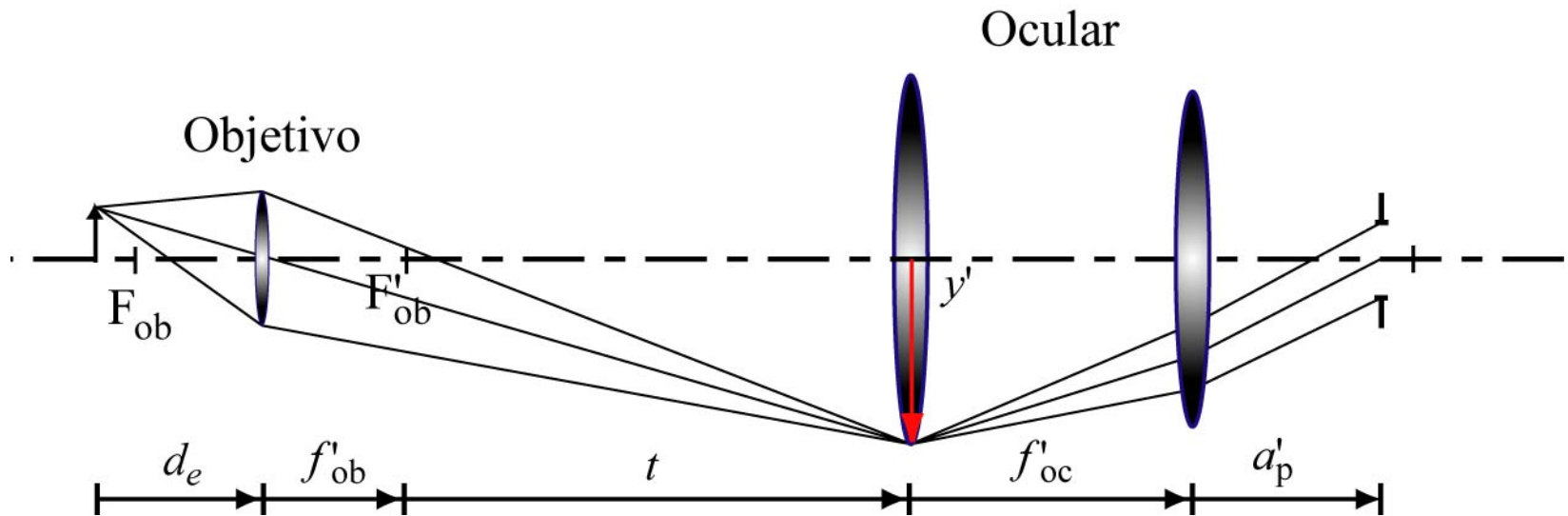
$$2\rho_m = \frac{f'_{ob} f'_{oc}}{t} \frac{\phi_{oc}}{a'_p} = \frac{0.25}{|\Gamma|} \frac{\phi_{oc}}{a'_p}$$

## Campo de iluminación media en el espacio objeto (Campo visual)

$$2\rho_m = \frac{f'_{ob} f'_{oc}}{t} \frac{\phi_{oc}}{a'_p} = \frac{0.25 \phi_{oc}}{|\Gamma| a'_p}$$

$2\rho_m$  es inversamente proporcional a  $\Gamma$  y  $a'_p$

Se utilizan oculares compuestos para aumentar el campo



## 6.6.- Profundidad de enfoque

En general: la longitud óptica  $t \approx f'_{ob}$



La posición de la P.S  $\cong$  Plano focal imagen del Microscopio



$$\Delta_e = f'_m{}^2 A_m$$

$$\Delta_e = \left( \frac{0.25}{\Gamma} \right)^2 A_m \quad (\text{Expresada en m})$$

El Microscopio trabaja en condiciones de **AUMENTO NORMAL**

**Ejemplo**

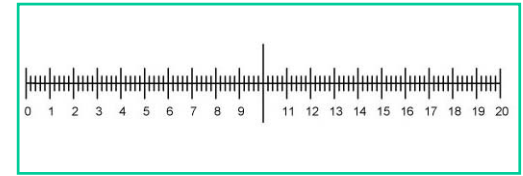
$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Microscopio de 100 Aumentos} \\ \text{Observador de } A_m = 4D \end{array} \right\} \Rightarrow \Delta_e = 0.025 \text{ mm} = 25 \mu\text{m}$$

- La profundidad de enfoque de un Microscopio es reducida.
- El mecanismo de enfoque ha de ser muy preciso.
- El Microscopio permite medir distancias axiales con gran precisión.





## 6.7.- Diafragma de campo y retículos

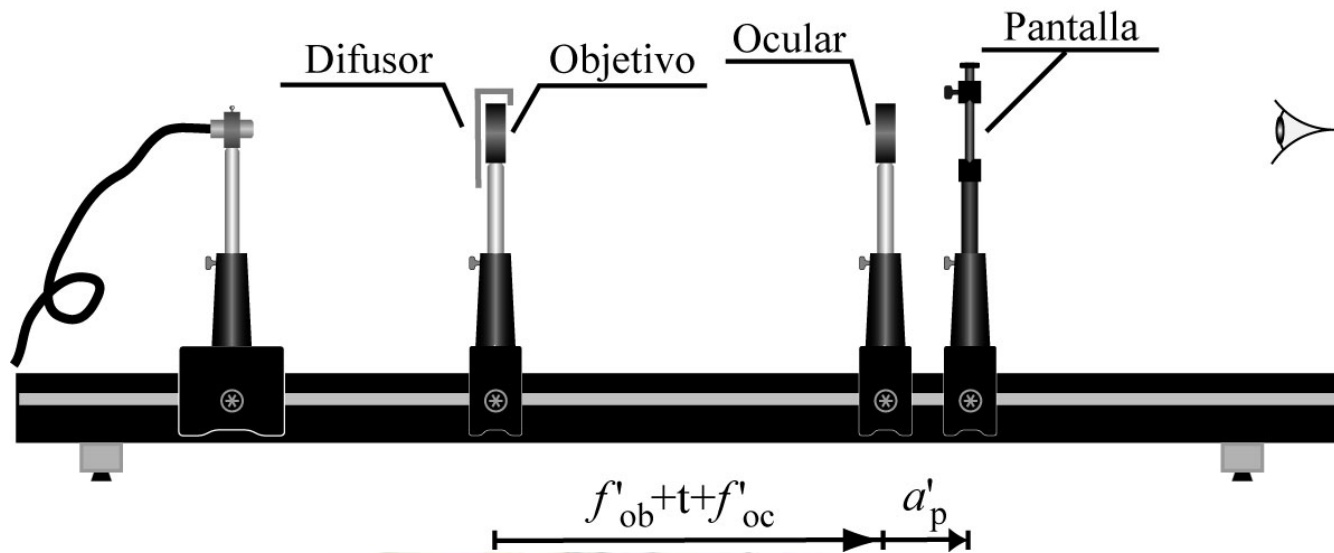


- El Microscopio compuesto presenta frente a la Lupa la ventaja adicional de la existencia de una imagen intermedia real.
- Sobre el plano de la imagen intermedia pueden situarse los siguientes elementos :
  - **Diafragma de campo:**
  - **Retículo:** Elemento transparente, con dibujo de líneas o escala.



## Práctica de laboratorio

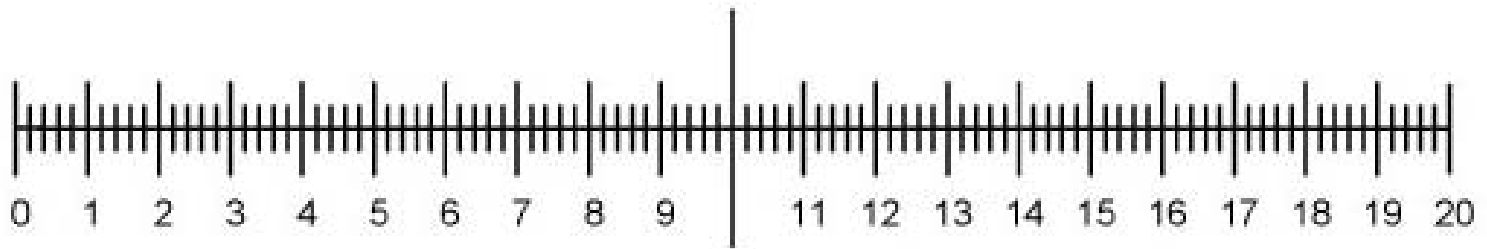
Para una observación óptica la pupila del ojo ha de situarse sobre la Pupila de Salida del Microscopio



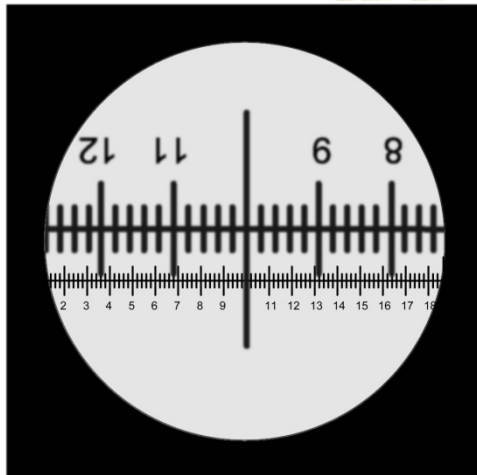
Determinación de la posición y tamaño de la Pupila de Salida

Escala de 20 mm

1 div = 0.2 mm



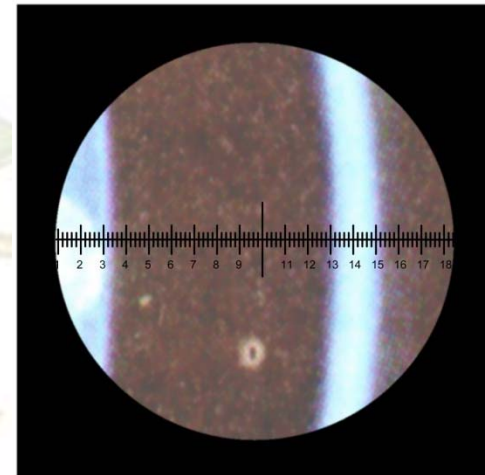
Medida del Aumento lateral del  
objetivo y del campo visual



$$\beta_{ob} = -3.2$$

$$2\rho_m \square 5.6mm$$

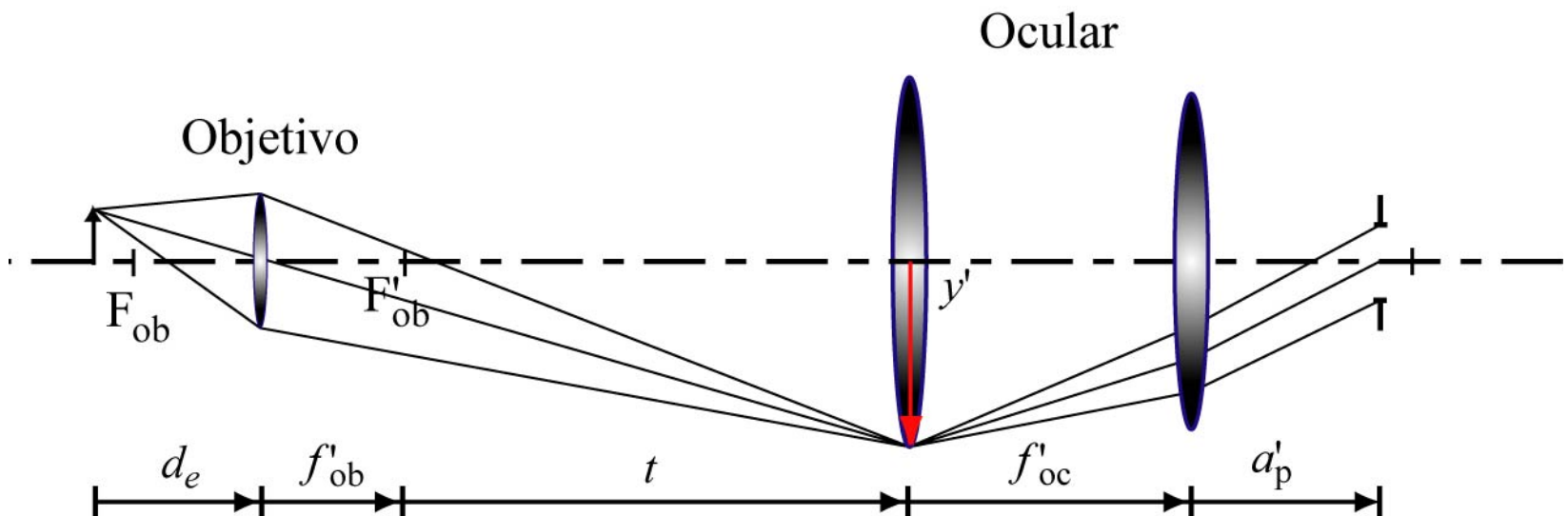
Medición de objetos

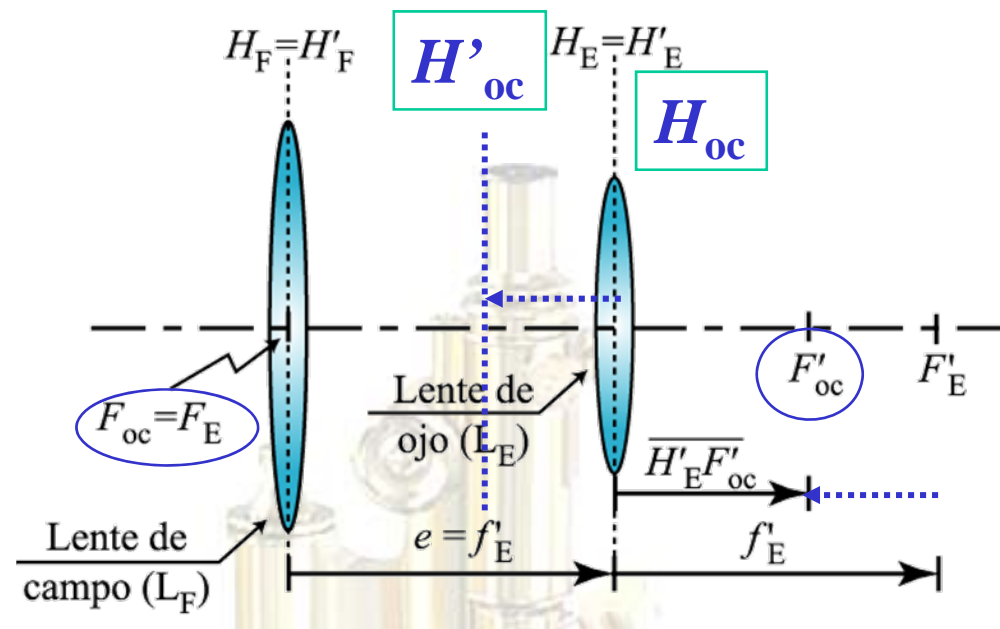


$$y = \frac{y'}{|\beta_{ob}|} = \frac{2.2mm}{3.2} \square 0.7mm$$

## 6.8.- Los oculares

El campo visual de un microscopio es inversamente proporcional al aumento visual del mismo. Como consecuencia de ello el campo visual de los microscopios de gran aumento es muy reducido. Para aminorar este problema, los microscopios, y en general todos los instrumentos ópticos visuales, incorporan oculares compuestos por dos lentes.





$$f' = \frac{f'_1 f'_2}{-t}$$

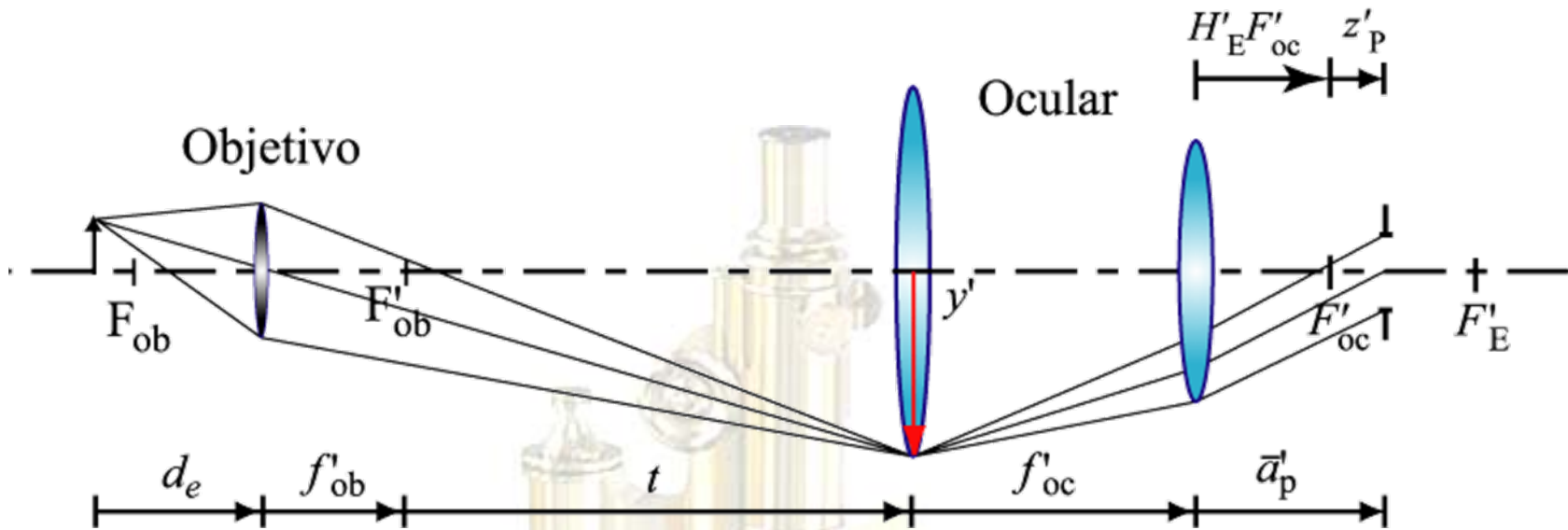
$$f'_{oc} = \frac{f'_F f'_E}{f'_F + f'_E - e} = f'_E$$

$$\overline{H_1 F}$$

$$\overline{H_F F_{oc}} = \frac{f'_F (e - f'_E)}{f'_F + f'_E - e} = 0$$

$$\overline{H'_2 F'}:$$

$$\overline{H'_E F'_{oc}} = \frac{f'_E (f'_F - e)}{f'_F + f'_E - e} = f'_E - \frac{f'^2_E}{f'_F}$$



$$\bar{a}'_p = \overline{H'_E F'_oc} + z'_p$$

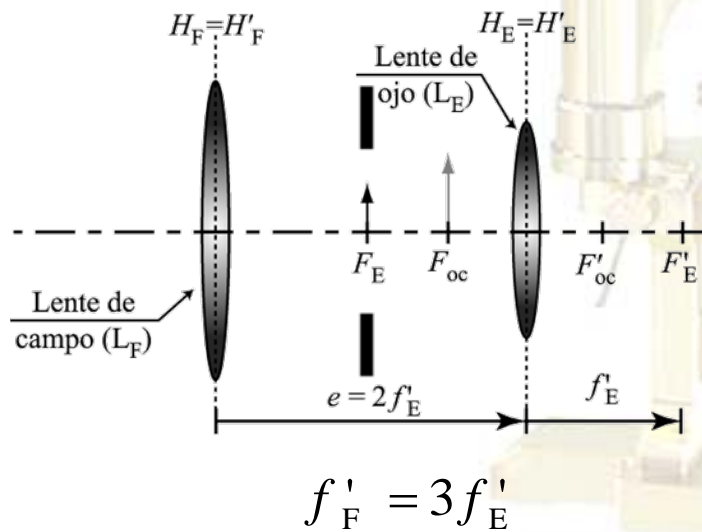
$$\bar{a}'_p = a'_p - \frac{f'^2_E}{f'_F}$$

$$2\bar{\rho}_m = \frac{250 \phi_E}{|\Gamma| \bar{a}'_p}$$

El campo aumenta al utilizar oculares compuestos

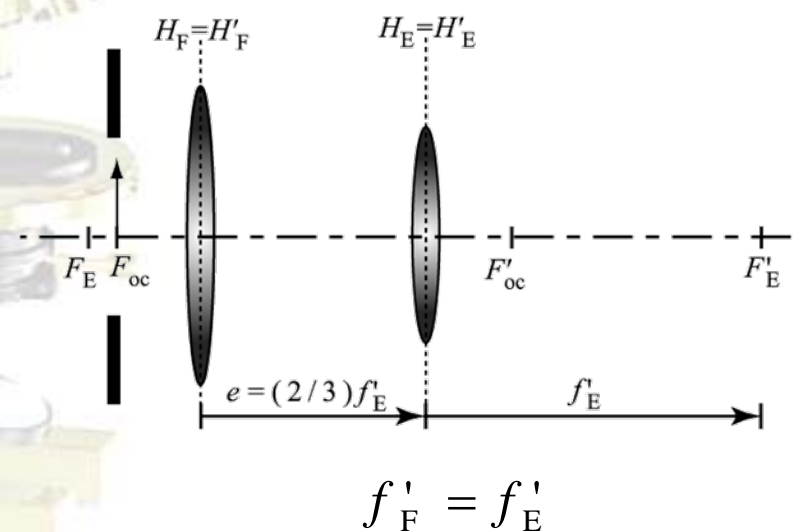
- El ocular analizado constituye la forma más simple de un ocular doble. No es conveniente, sin embargo, situar la lente de campo sobre la imagen intermedia proporcionada por el objetivo, ya que:
  - Es preciso evitar que posibles ralladuras o motas de polvo presentes en la lente de campo aparezcan superpuestas con la imagen final.
  - En muchas ocasiones, es necesario colocar sobre esta imagen intermedia un retículo para poder efectuar mediciones del objeto.
- En general, el diseño de los oculares es bastante complejo ya que se ha de tener en cuenta, además, la compensación de aberraciones.

### Huygens



(3,2,1)

### Ramsdem



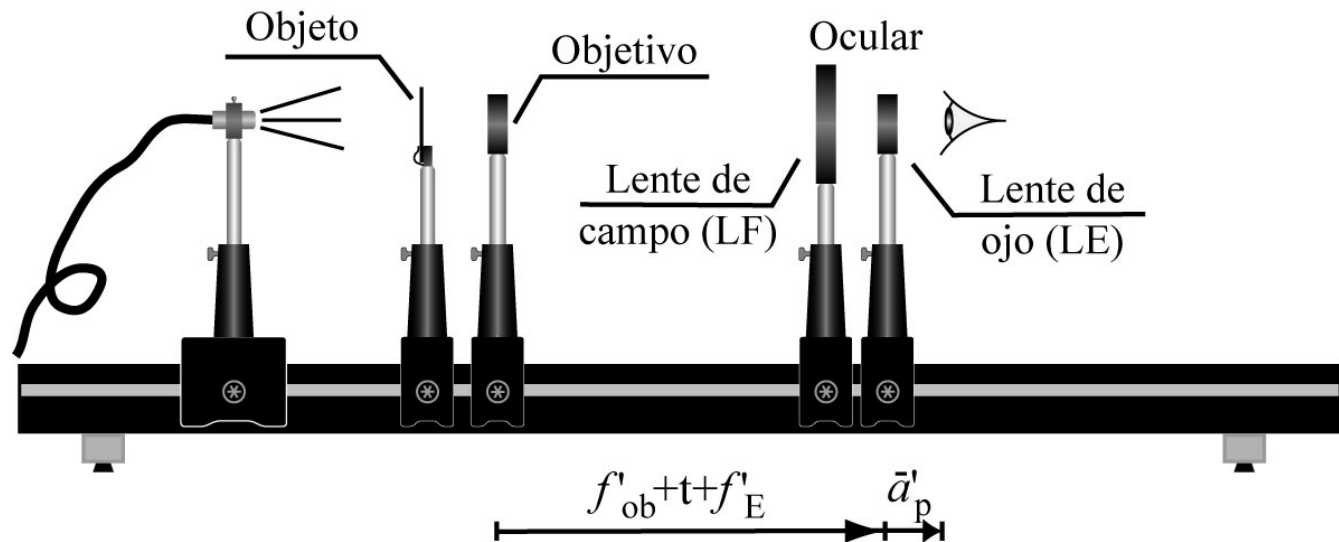
$f'_F = f'_E$

(3,2,3)

### Símbolo del Doblete

$(f'_1, e, f'_2)$

# Práctica de laboratorio

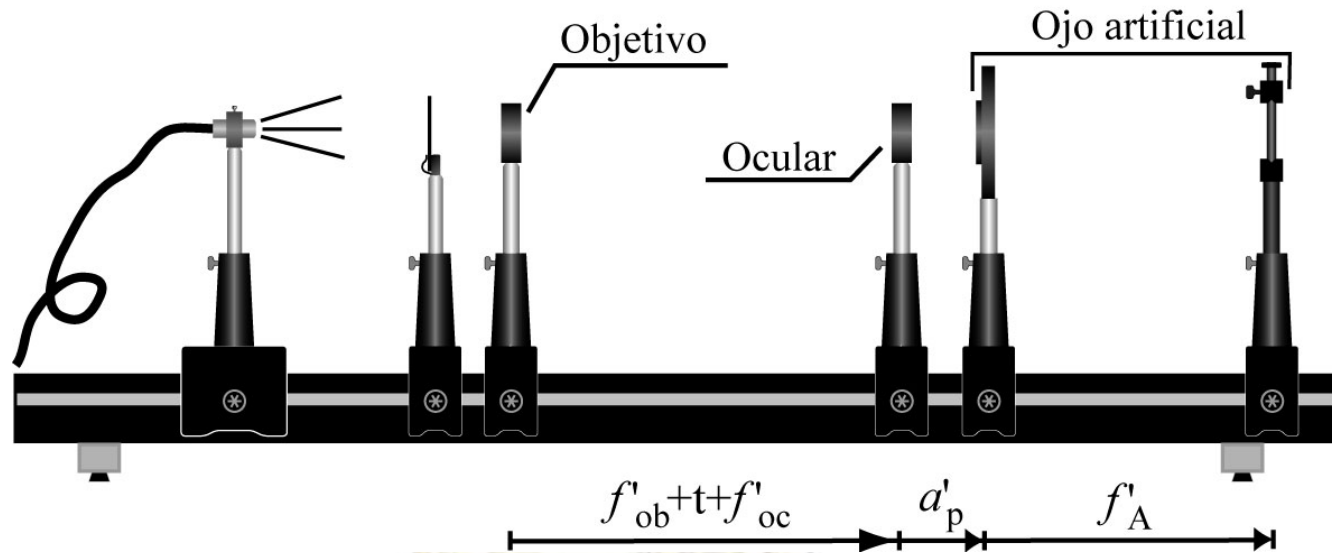


## Construcción de un Microscopio con ocular doble.

Estudio de la influencia de la Lente de campo:

- Posición y tamaño de la Pupila de salida:
  - La emergencia pupilar disminuye.
  - El diámetro de la PS no cambia.
- ⇒ • Campo visual: Aumenta.
- ⇒ • Aumento visual: No varía.





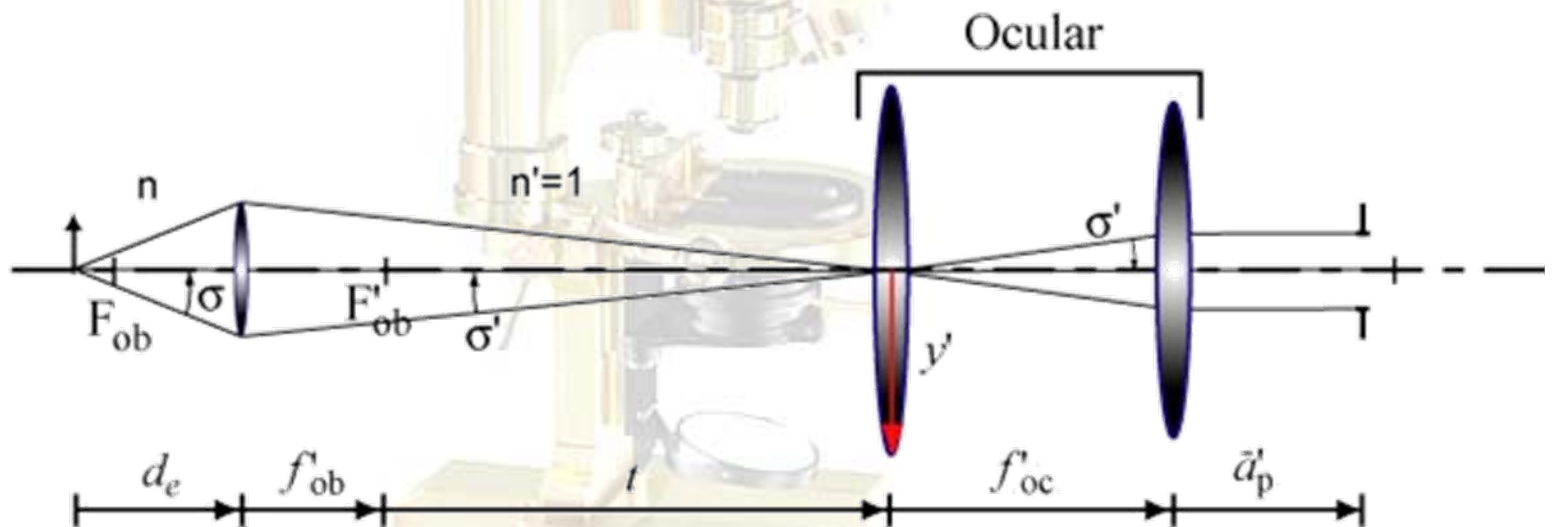
$$\Gamma = \frac{\tan w'}{\tan w_A} \left\{ \begin{array}{l} \tan w' = \frac{y_r'}{f'_A} \\ \tan w_A = \frac{y}{250} \end{array} \right.$$

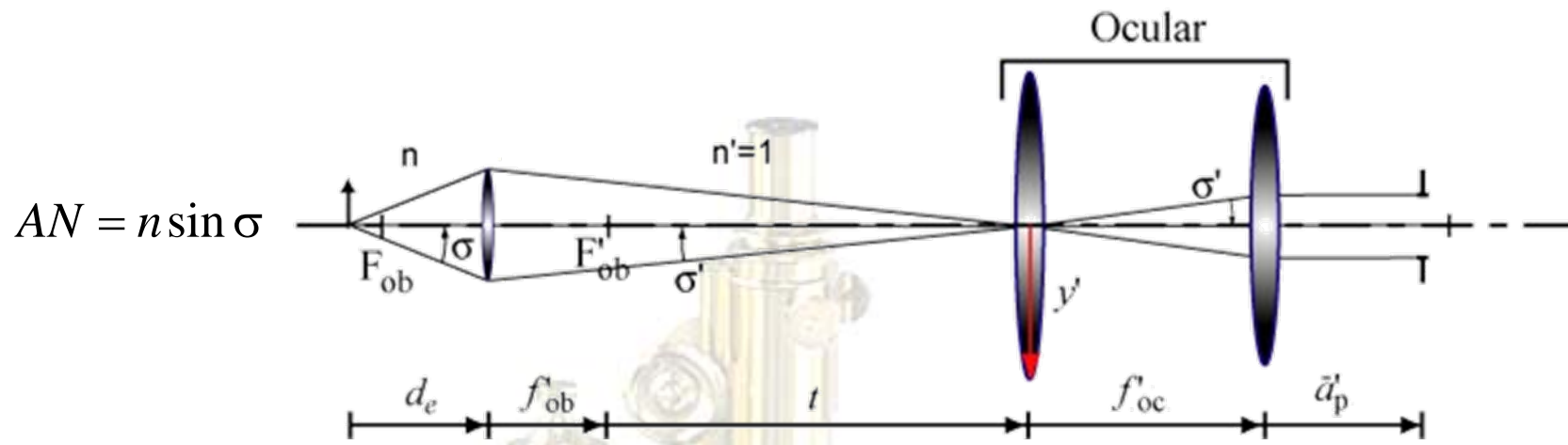
Medida del Aumento visual del Microscopio  
con ocular simple y con ocular doble.

## 6.9.- Apertura numérica del objetivo

Para caracterizar la apertura del haz útil en un microscopio se utiliza la denominada **apertura numérica**. Esta magnitud juega un papel decisivo tanto en la luminosidad como en el poder separador del microscopio.

$$AN = n \sin \sigma$$





$$AN = n \sin \sigma$$

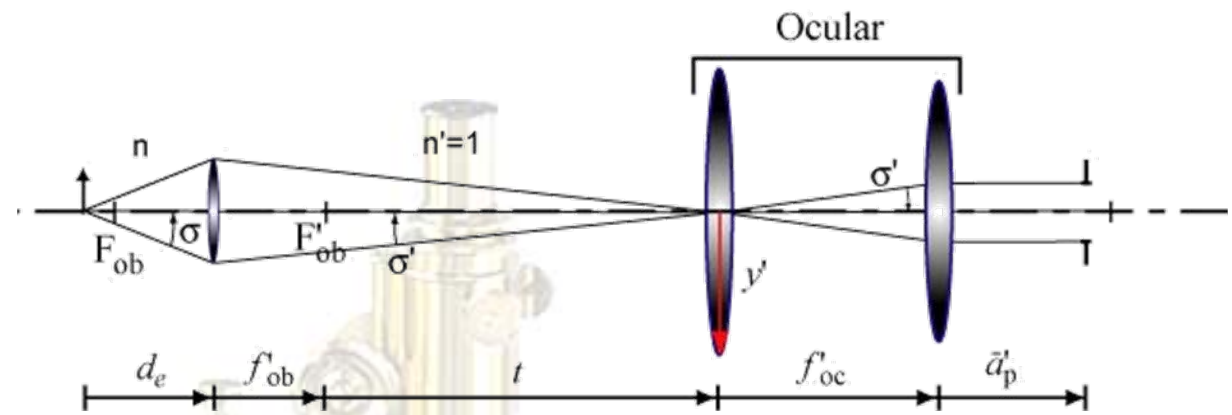
$$\phi_{PS} = -2f'_{oc} \sin \sigma'$$

$$\sin \sigma' = \frac{n \sin \sigma}{\beta_{ob}} = \frac{AN}{\beta_{ob}}$$

$$\phi_{PS} = 0.5 \frac{AN}{|\Gamma|} m = 500 \frac{AN}{|\Gamma|} mm$$



$$AN = n \sin \sigma$$



$$\phi_{PS} = 0.5 \frac{AN}{|\Gamma|} m = 500 \frac{AN}{|\Gamma|} mm$$

Ejemplo

$$\left. \begin{array}{l} AN = 0.50 \\ |\Gamma| = 40 \times 10 = 400 \end{array} \right\} \phi_{PS} = 500 \frac{0.50}{400} = 0.625 mm$$

$|\beta_{ob}| = 40 \times$        $\Gamma_{oc} = \times 10$

## 6.10.- Luminosidad

Para el caso de **objetos extensos**, se define la luminosidad como el cociente entre la iluminación retiniana en visión a través del instrumento óptico, y la obtenida en visión directa.

$$C_e = \frac{E'_r}{E'_A} = \tau \left( \frac{\phi_{PS}^{ef}}{\phi_A} \right)^2$$

En la práctica totalidad de los casos la pupila de salida del microscopio constituye la pupila de salida efectiva del acoplamiento.

$$C_e = \tau \left( \frac{500 AN}{\Gamma \phi_A} \right)^2 = \tau \left( \frac{500}{\Gamma_{oc} \phi_A} \right)^2 \left( \frac{AN}{\beta_{ob}} \right)^2$$

Ejemplo

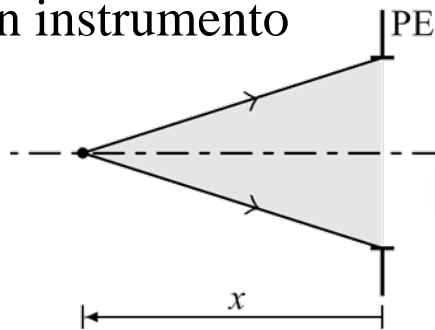
$$\left. \begin{array}{l} AN = 0.50 \\ |\Gamma| = 40 \times 10 = 400 \\ \phi_A = 4 \text{ mm} \end{array} \right\} C_e = (0.75) \left( \frac{500 \times 0.50}{400 \times 4} \right)^2 \approx 0.02$$

En el caso en que, sobre un fondo oscuro, el objeto observado es puntual, o sus dimensiones tan reducidas que su imagen impresiona un único fotorreceptor, la luminosidad vale

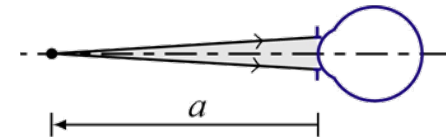
$$C_p = \frac{\Phi'_r}{\Phi'_A} = \tau \left( \frac{a}{x} \right)^2 \left( \frac{\phi_{PE}^{ef}}{\phi_A} \right)^2$$

Observación

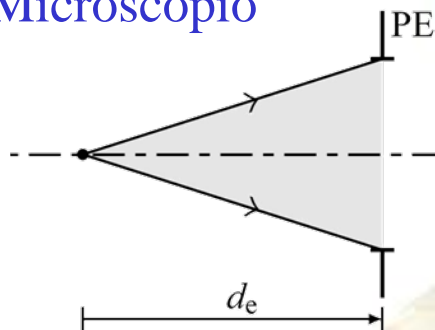
con instrumento



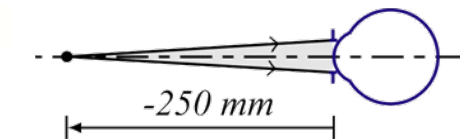
Observación directa



Microscopio



Observación directa



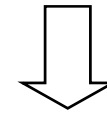
$$C_p = \frac{\Phi'_r}{\Phi'_A} = \tau \left( \frac{250}{d_e} \right)^2 \left( \frac{\phi_{PE}^{ef}}{\phi_A} \right)^2$$


 $C_p$ 

$$\frac{\phi_{PS}}{\phi_{PE}} = |\beta_p|$$

 $d_e$ 

$$C_p = \left( \frac{250}{f'_{ob} f'_{oc} / t} \right)^2 \tau \left( \frac{\phi_{PS}^{ef}}{\phi_A} \right)^2$$



$$C_p = \Gamma^2 C_e$$

$$\text{Ganancia en contraste : } G_c = \frac{C_p}{C_e} = \Gamma^2$$

**Ejemplo**

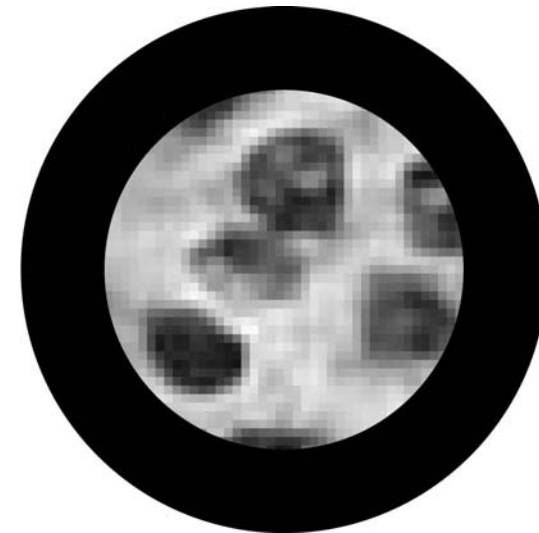
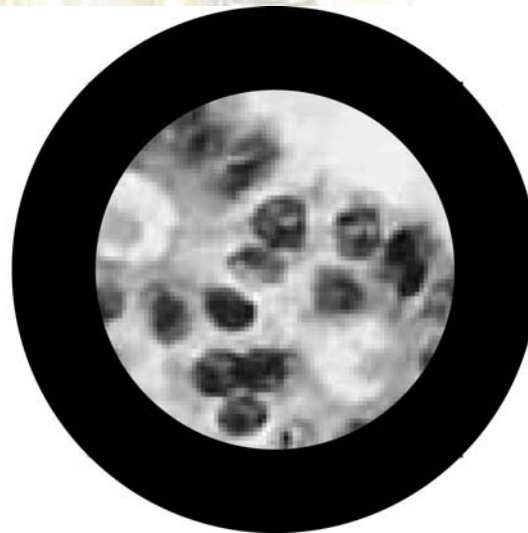
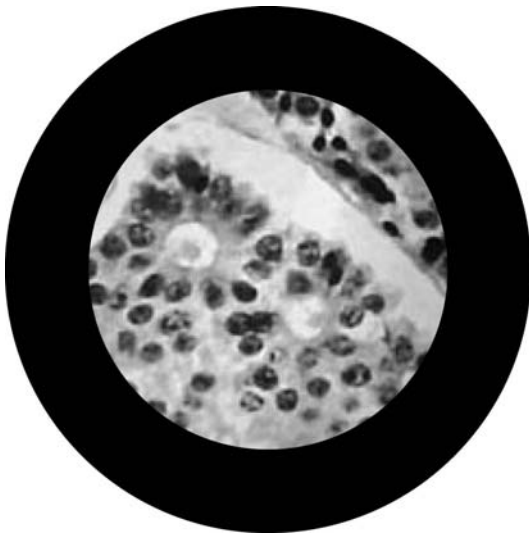
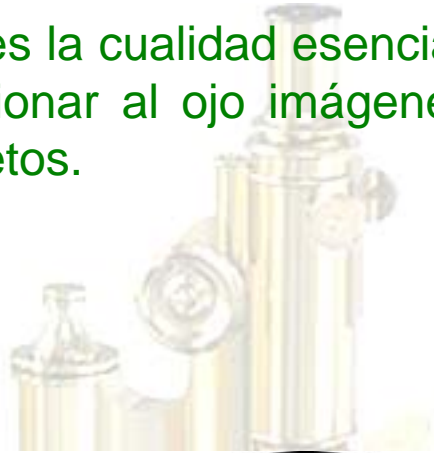
$$\left. \begin{array}{l} AN = 0.50 \\ |\Gamma| = 40 \times 10 = 400 \\ \phi_A = 4 \text{ mm} \end{array} \right\}$$

$$C_p = \Gamma^2 C_e = 400^2 \times 0.02 = 3200$$



## 6.11 Poder separador

El poder separador es la cualidad esencial de un microscopio ya que su finalidad es proporcionar al ojo imágenes discernibles de los detalles más finos de los objetos.







Según se establece en el Tema 3, y supuesto que las aberraciones han sido convenientemente corregidas, el poder separador está limitado por el fenómeno de la difracción y por la estructura discreta de la retina.

- A los efectos de la **difracción**, y asumiendo que la Pupila de Salida del Microscopio es menor que la Pupila de Entrada del ojo, el límite de resolución vale:

$$\eta_{\text{dif}} = \frac{0.61\lambda}{AN} \quad \rightarrow \quad \eta_{\text{dif}} = \frac{0.33}{AN} \mu\text{m}$$

$\lambda \approx 0.55 \mu\text{m}$

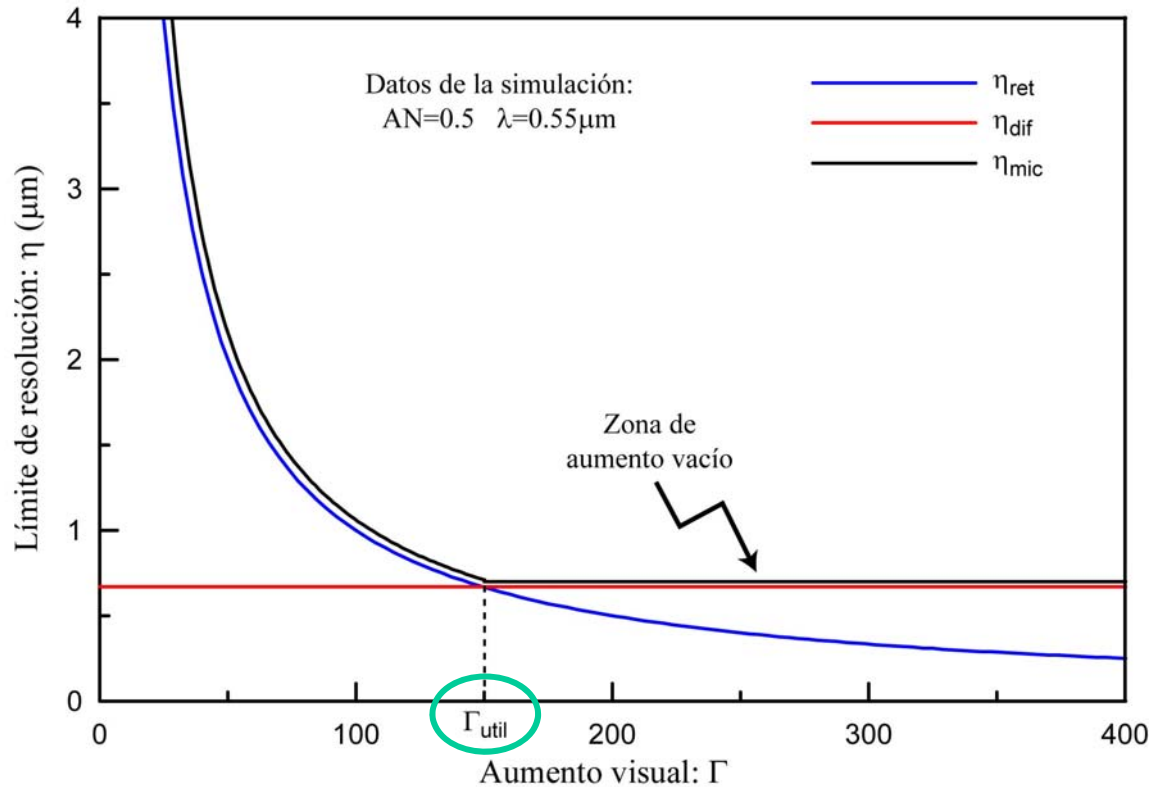
- Con respecto a la influencia de la **estructura de la retina**, al igual que en el caso de la Lupa, el límite de resolución vale:

$$\eta_{\text{ret}} = 250 \frac{\tan(\alpha_A)}{|\Gamma|} \approx \frac{1}{10|\Gamma|} \text{mm} = \frac{100}{|\Gamma|} \mu\text{m}$$

$$\alpha_A = 80''$$



- Si consideramos conjuntamente ambos factores:  $\eta_{mic} = \max \left\{ \frac{0.61\lambda}{AN}, \frac{100}{|\Gamma|} \right\}$



La intersección de las dos curvas define el *aumento útil* o *superresolvente*:

$$|\Gamma_{util}| = 100 \frac{AN}{0.61\lambda} \quad \longrightarrow \quad |\Gamma_{util}| = 300 AN$$

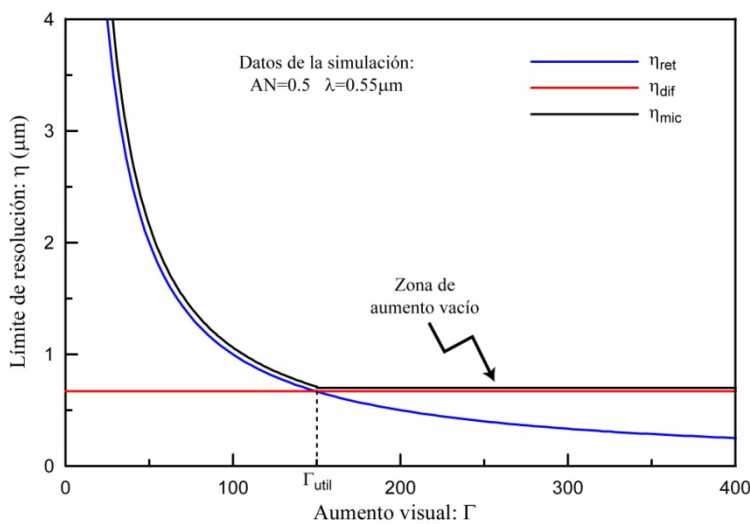
$\lambda \approx 0.55 \mu\text{m}$

## Ejemplo

$$AN = 0.5 \quad \Gamma_{oc} = 10 \quad \phi_{oc} = 10mm$$

$$\beta_{ob} = -15 \Rightarrow$$

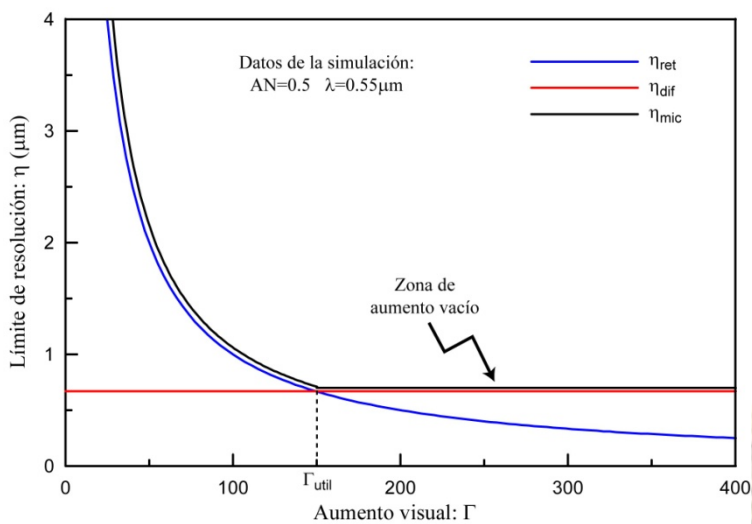
$$|\Gamma_{util}| = 150$$



$$\eta_{mic} = \frac{100}{|\Gamma|} = \frac{100}{150} \mu m = 0.67 \mu m$$

$$C_e = \tau \left( \frac{500 AN}{\Gamma \phi_A} \right)^2 = 0.75 \left( \frac{500 \times 0.5}{150 \times 4} \right)^2 = 0.13$$

$$2\rho_m = \frac{250}{|\Gamma|} \frac{\phi_{oc}}{a'_p} \approx \frac{250}{|\Gamma|} \frac{\phi_{oc}}{f'_{oc}} = \frac{250 \times 10}{150 \times 25} = 0.67 mm$$



$$AN = 0.5 \quad \Gamma_{\text{oc}} = 10 \quad \phi_{\text{oc}} = 10\text{mm}$$

$$\beta_{\text{ob}} = -30 \Rightarrow$$

$$|\Gamma| = 300$$

$$|\Gamma_{\text{util}}| = 150$$

$$\eta_{\text{mic}} = 0.67\mu\text{m}$$

$$C_e = \tau \left( \frac{500 AN}{\Gamma \phi_A} \right)^2 = 0.75 \left( \frac{500 \times 0.5}{300 \times 4} \right)^2 = 0.033$$

$$2\rho_m = \frac{250 \phi_{\text{oc}}}{|\Gamma| a'_p} \approx \frac{250 \phi_{\text{oc}}}{|\Gamma| f'_{\text{oc}}} = \frac{250 \times 10}{300 \times 25} = 0.33\text{mm}$$

$$\eta_{\text{mic}} = 0.67\mu\text{m}$$

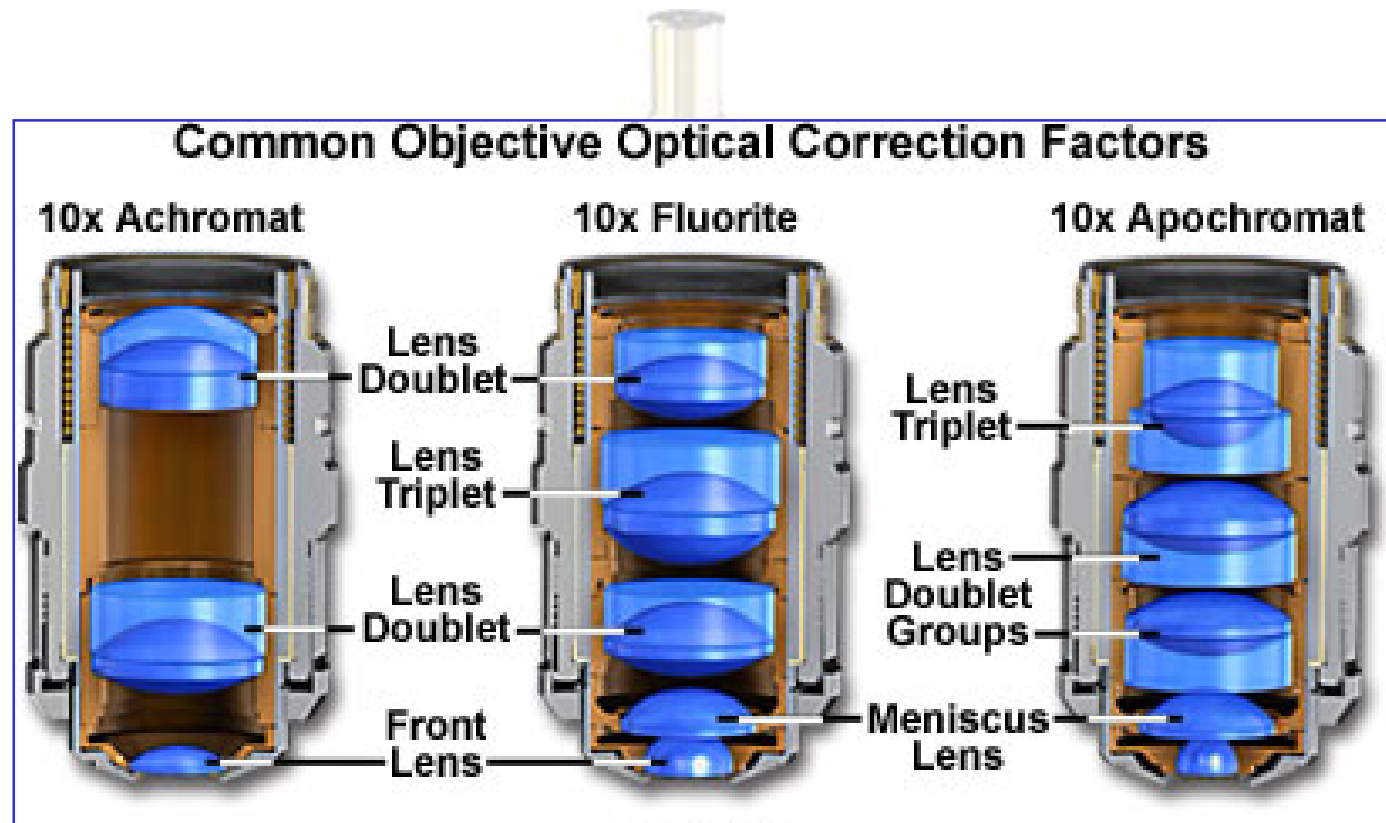
$$C_e = 0.13$$

$$2\rho_m = 0.67\text{mm}$$

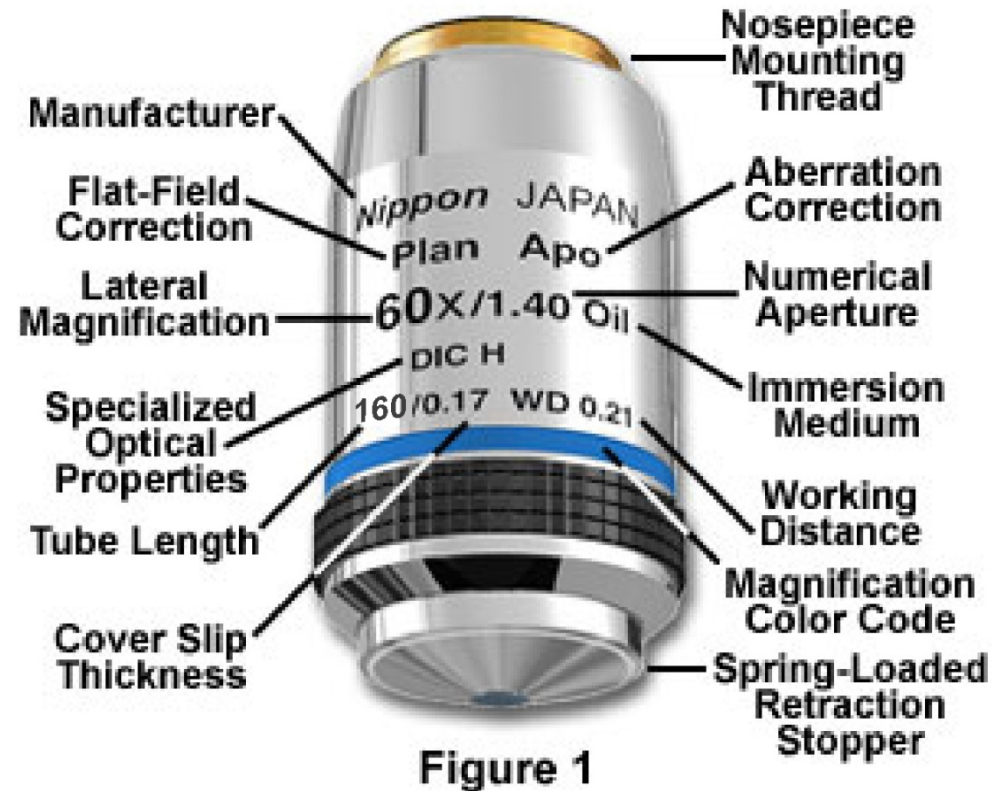


## 6.12 Objetivos de microscopio

- Los objetivos de microscopio se diseñan para proyectar sobre el plano focal objeto del ocular una imagen aumentada del objeto. El diseño de los objetivos busca la corrección óptima de las aberraciones para valores de la AN lo más altos que sea posible. Cuanto mejor es la corrección de aberraciones y más alta la AN, mayor es la dificultad de diseño y, por tanto, el precio del objetivo.
- **Objetivos acromáticos:** Son los más baratos (y comunes). Corrigen la aberración cromática axial para dos  $\lambda$  (rojo y azul) y la aberración esférica para el verde.
- **Objetivos semi-apocromáticos –fluorita (Ph):** Corrigen la aberración cromática axial para dos  $\lambda$  (rojo y azul) y la aberración esférica también para dos  $\lambda$ .
- **Objetivos apocromáticos:** Corrigen la aberración cromática axial para tres  $\lambda$  (rojo, verde y azul) y la aberración esférica para dos  $\lambda$ .

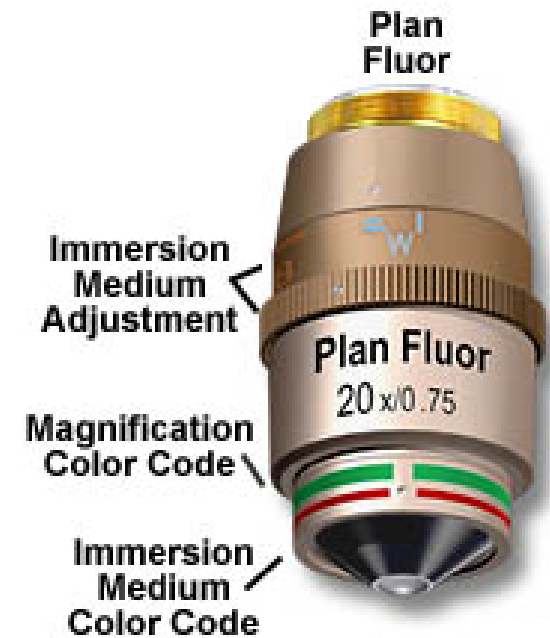


## 60x Plan Achromat Objective



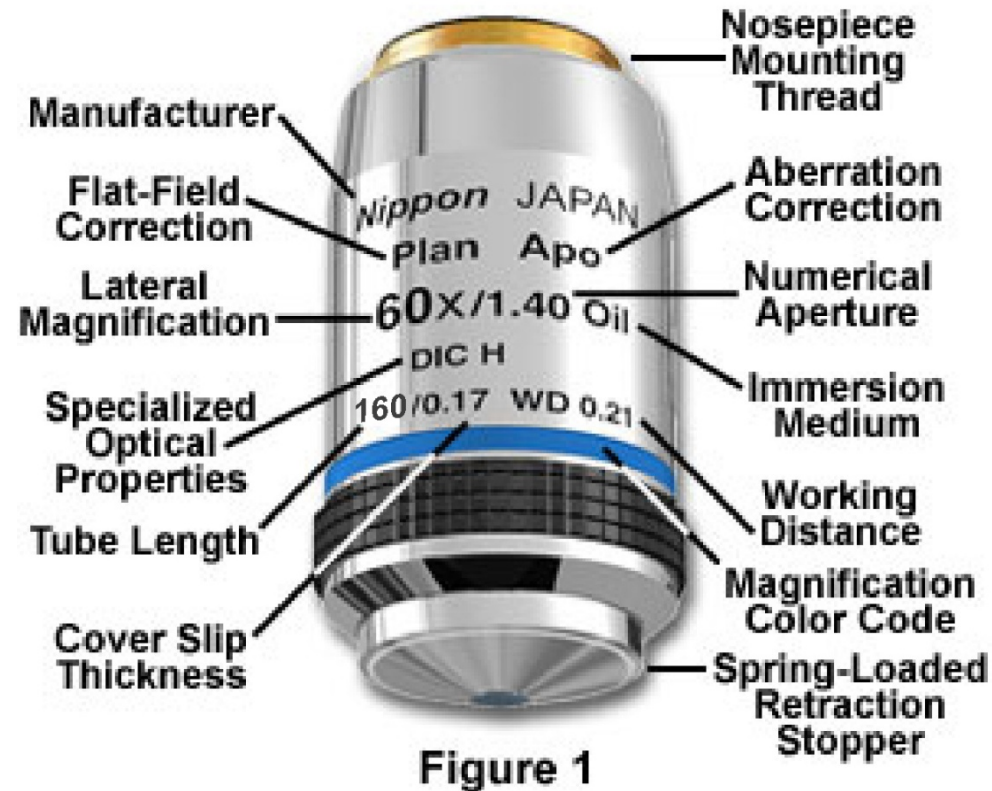
## Objective Color Codes

Magnification	Color Code
1/2x	No Color Assigned
1x	Black
1.25x	Black
1.5x	Black
2x	Brown
2.5x	Brown
4x	Red
5x	Red
10x	Yellow
16x	Green
20x	Green
25x	Turquoise
32x	Turquoise
40x	Light Blue
50x	Light Blue
60x	Cobalt Blue
63x	Cobalt Blue
100x	White
150x	White
250x	White
Immersion Media	Color Code
Oil	Black
Glycerol	Orange
Water	White
Special	Red

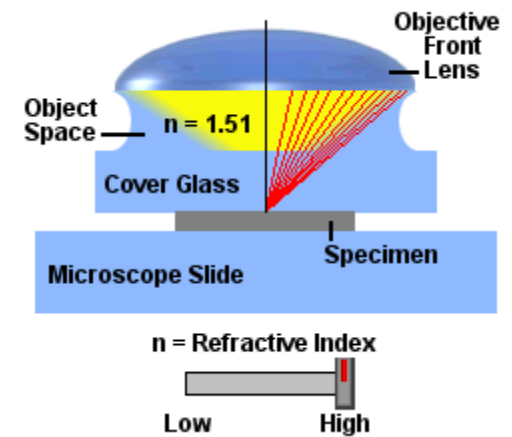
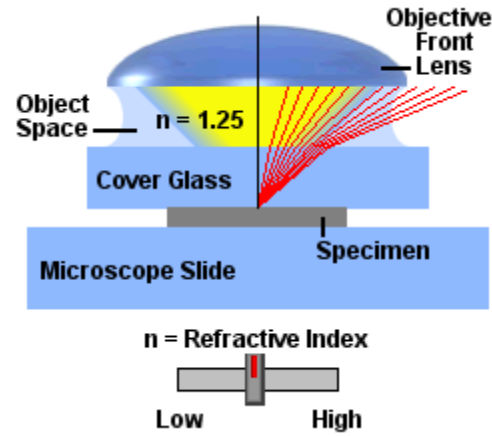
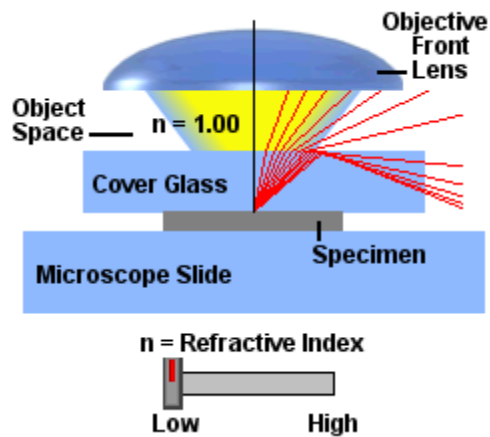




## 60x Plan Achromat Objective



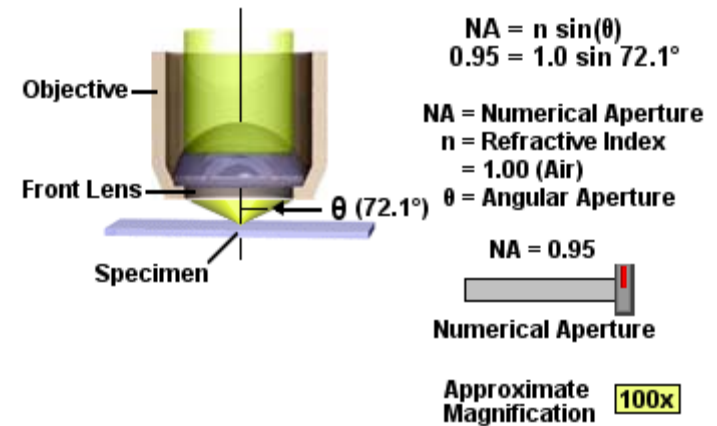
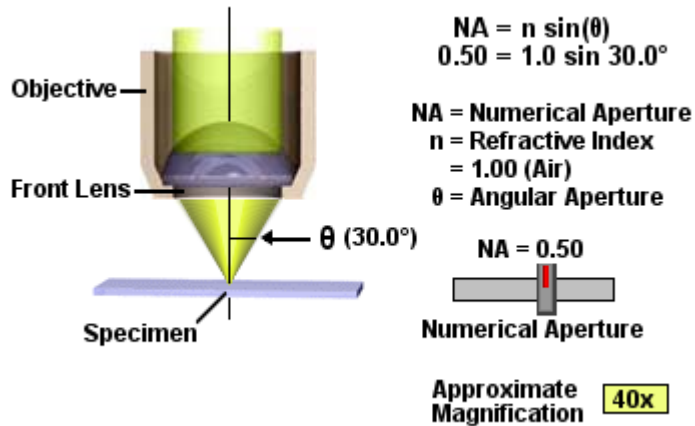
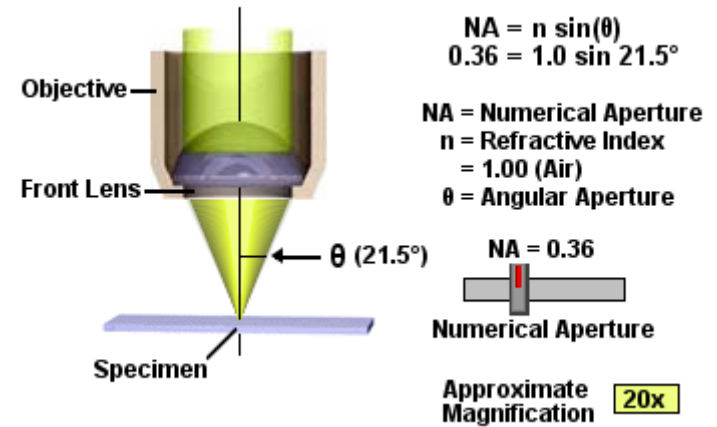
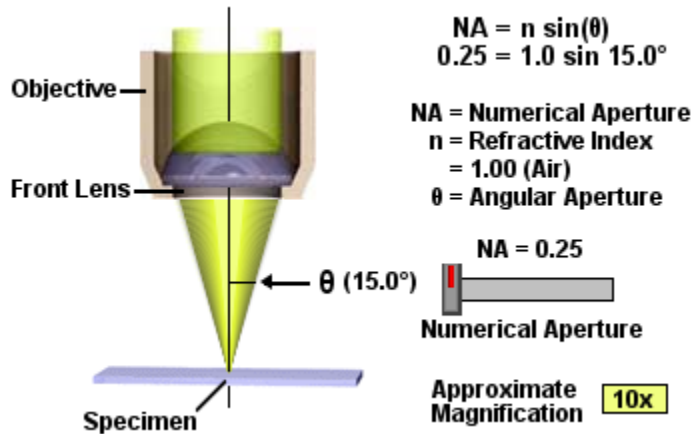
# Objetivos de inmersión



$$AN = n \sin \sigma$$

<http://www.microscopyu.com/tutorials/java/objectives/immersion/index.html>

# Apertura Numérica y distancia de enfoque



<http://www.microscopyu.com/tutorials/java/objectives/nuaperture/index.html>

## Objective Numerical Aperture and Working Distance

Optical Correction <sup>a</sup> and Magnification	Numerical Aperture	Working Distance (Millimeters)
ACH 10x	0.25	6.10
ACH 20x	0.40	3.00
ACH 40x	0.65	0.45
ACH 60x	0.80	0.23
ACH 100x (Oil)	1.25	0.13
PL 4x	0.10	22.0
PL 10x	0.25	10.5
PL 20x	0.40	1.20
PL 40x	0.65	0.56
PL 100x (Oil)	1.25	0.15
PL FL 4x	0.13	17.0
PL FL 10x	0.30	10.00
PL FL 20x	0.50	1.60
PL FL 40x	0.75	0.51
PL FL 100x (Oil)	1.30	0.10
PL APO 1.25x	0.04	5.1
PL APO 2x	0.06	6.20
PL APO 4x	0.16	13.00
PL APO 10x	0.40	3.10
PL APO 20x	0.70	0.65
PL APO 40x	0.85	0.20
PL APO 60x (Oil)	1.40	1.10
PL APO 100x (Oil)	1.40	0.10

<sup>a</sup>Abbreviations:

ACH, Achromat

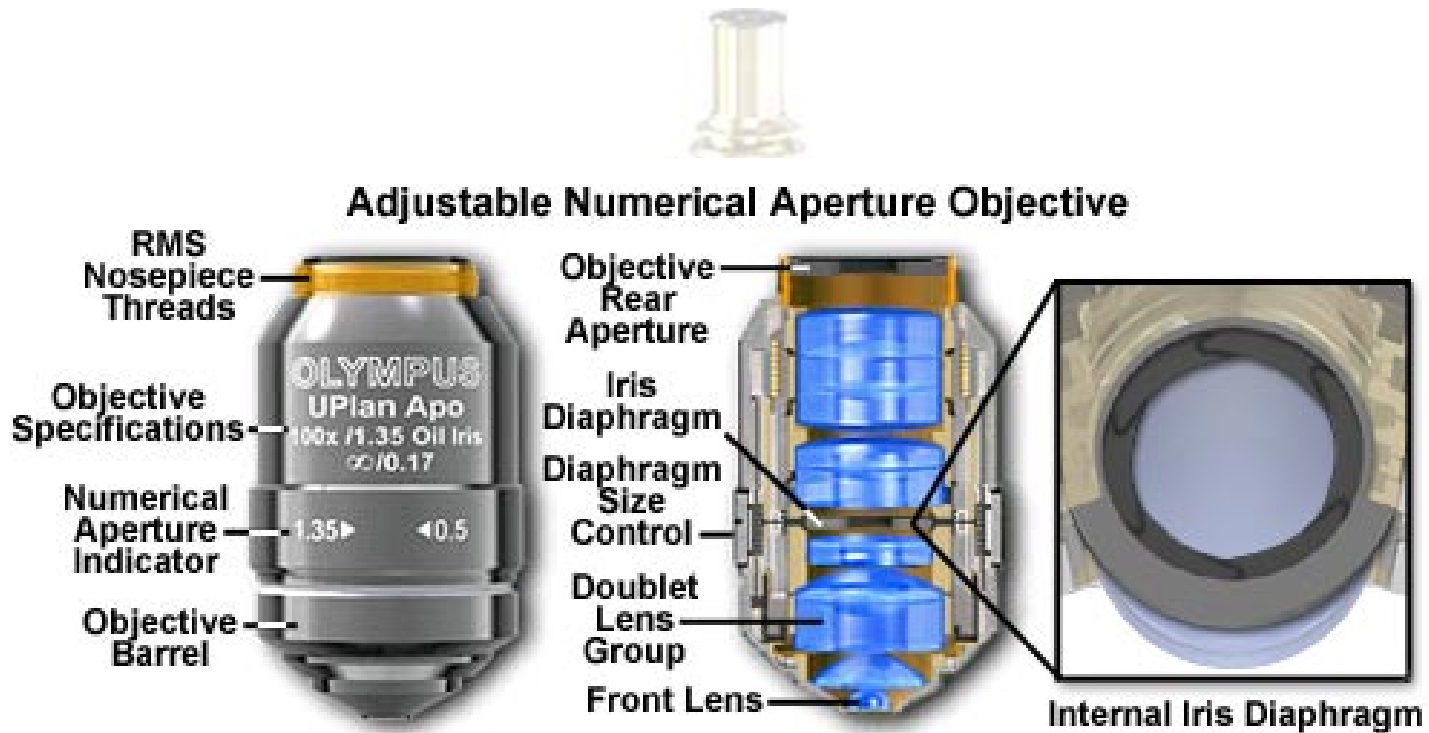
PL, Plan Achromat

PL FL, Plan Fluorite

PL APO, Plan Apochromat

Table 2

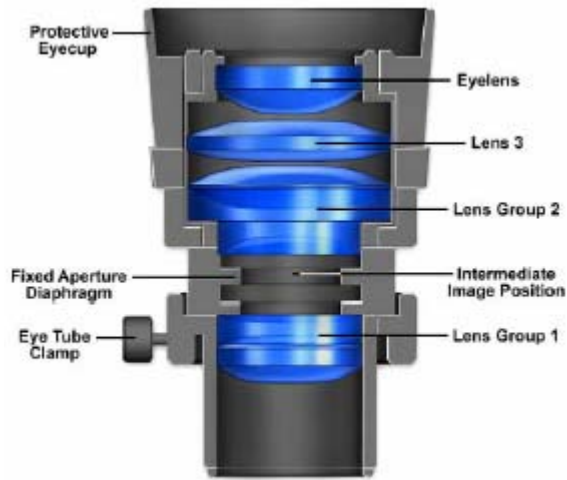




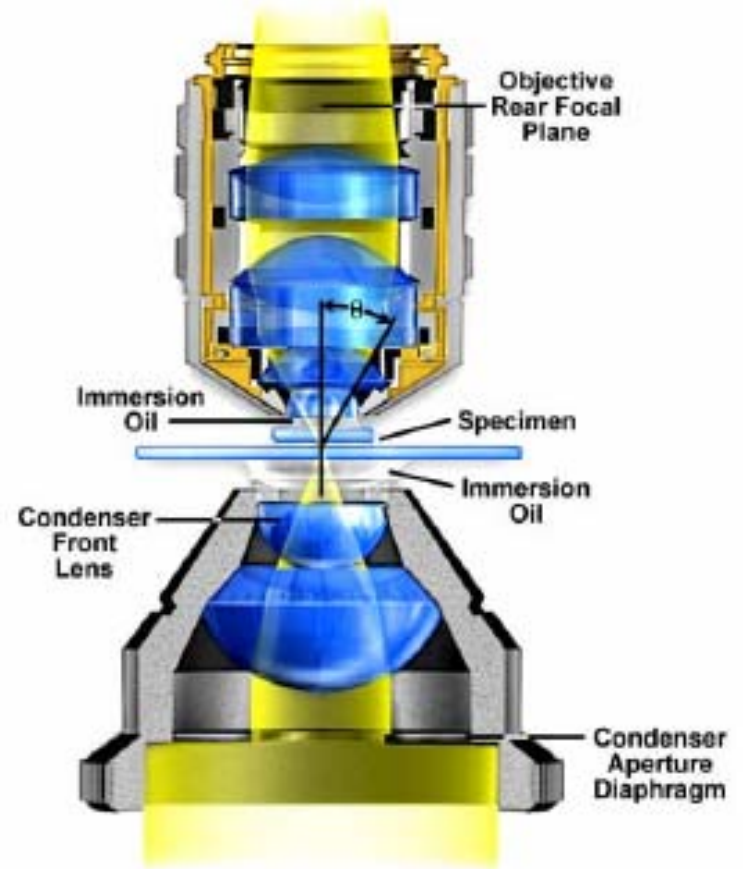
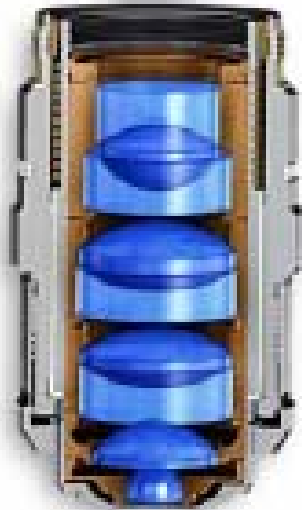
**Figure 6**

<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/specialobjectives.html>

## Ocular



## Objetivo





**Henry Crouch's  
Microscope  
(circa late 1800s)**



**Andrew Ross  
Compound  
Monocular  
Microscope  
(circa 1904)**



**Leitz Monocular  
Microscope  
(circa 1930s)**



**The Olympus  
Provis AX-70  
(circa 1998)**

