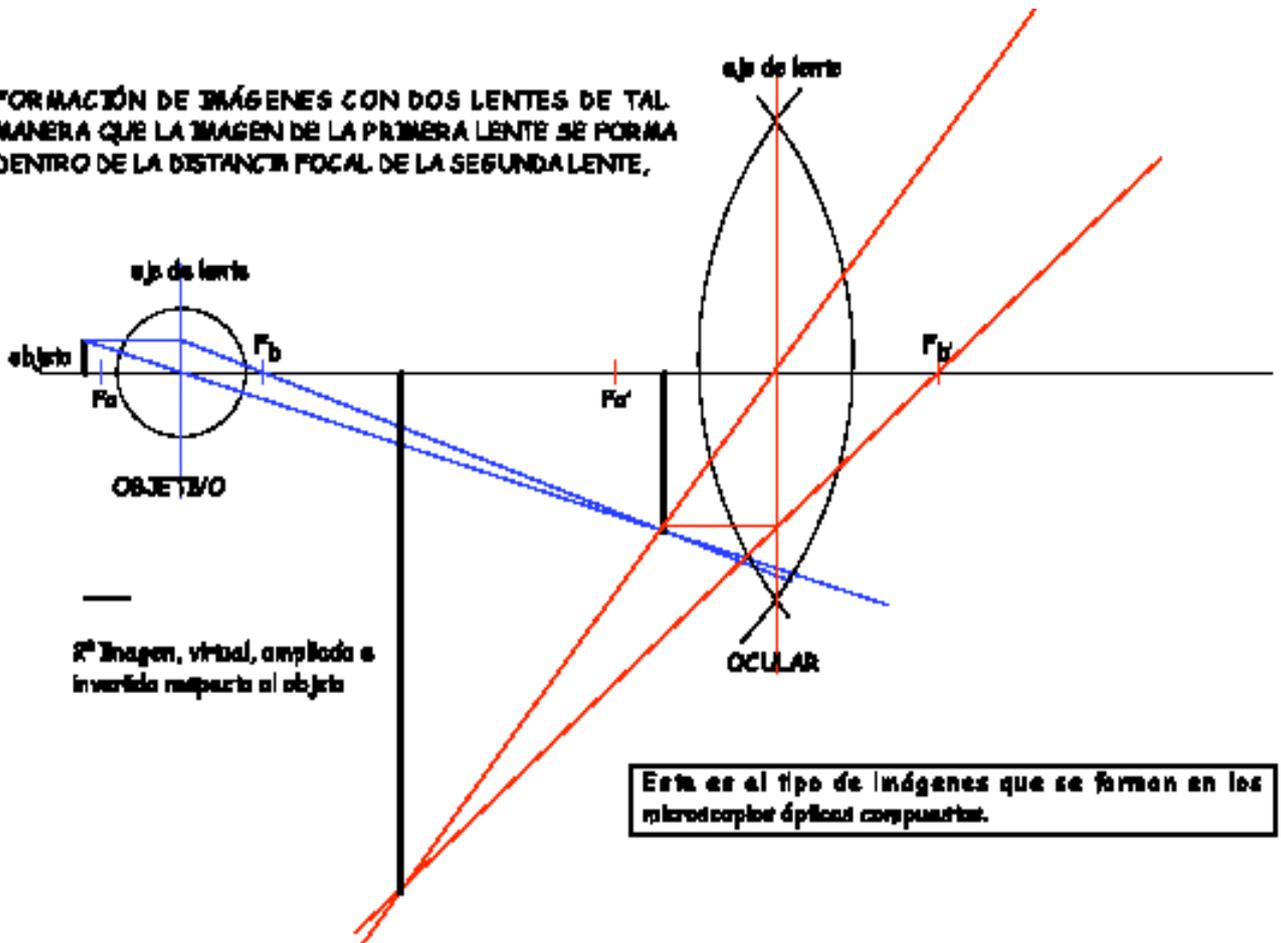


FORMACIÓN DE IMÁGENES CON DOS LENTES DE TAL MANERA QUE LA IMAGEN DE LA PRIMERA LENTE SE FORMA DENTRO DE LA DISTANCIA FOCAL DE LA SEGUNDA LENTE,



Sobre un eje óptico se colocan los dos sistemas de lentes de tal manera que: Un objeto colocado fuera de la distancia focal del primer sistema de lentes (objetivo) pero muy próximo al foco, forma una primera imagen real, invertida y ampliada en un plano concreto que debe estar situado dentro de la distancia focal del segundo sistema de lentes (ocular), a través del cual se forma una imagen virtual, invertida respecto al objeto y mucho más ampliada. El número total de aumentos viene dado por el producto de los aumentos del objetivo y los aumentos del ocular (ver ejemplo en tabla de [características ópticas](#) de un microscopio Nikon estándar).

OBJETIVOS



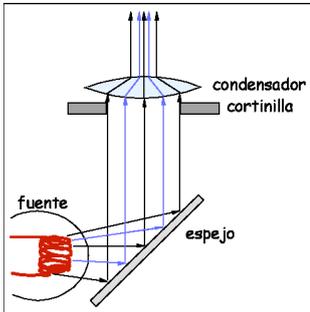
OCULARES



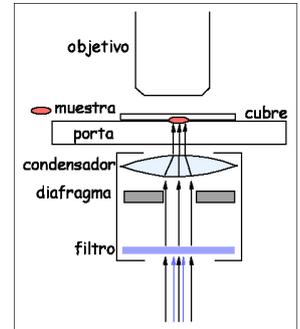
OCULAR: 10x; (OCULAR 16x ENTRE PARÉNTESIS)			
OBJETIVO	AUMENTOS	APERTURA	
COLOR	AUMENTOS	TOTALES	NUMÉRICA
rojo	4x	40 (64)	0.1
amarillo	10x	100 (160)	0.25
azul	40x	400 (640)	0.65
blanca	100x	1000 (1600)	1.25

CAMPO REAL	PROFUNDIDAD DE CAMPO	PODER DE RESOLUCIÓN	DISTANCIA DE TRABAJO
4.5mm	63.2µm	2.8µm	28mm
18mm	10.1µm	1.1µm	8mm
0.45mm	0.97µm	0.42µm	0.79mm
0.18mm	0.33µm	0.22µm	0.16mm

El tubo óptico va montado sobre una serie de piezas mecánicas que facilitan su utilización y además se le añaden otra serie de sistemas óptico – mecánicos (condensadores y diafragmas) para la mejor observación de la imagen ampliada.



El sistema de iluminación, que empezó siendo un espejo cóncavo que concentraba los haces luminosos de una fuente externa, en la actualidad suele ser una bombilla eléctrica de alta densidad lumínica (bajo voltaje). La luz generada se orienta verticalmente mediante un espejo y se hace pasar por una cortinilla y una lente biconvexa que concentra los rayos lumínicos. Este haz luminoso cuando se encuentra cerca del objeto (preparación) se somete a otro proceso de concentrado al hacerle atravesar un diafragma de cortinilla y otra lente convexa (condensador). De esta forma se consigue iluminar muy intensamente un pequeño campo (ver ejemplo de tamaños de



campo de objetivos nikon estandar).

CONDENSADOR-DIAFRAGMA



PORTA FILTROS (FILTRO AZUL)

DIAFRAGMA

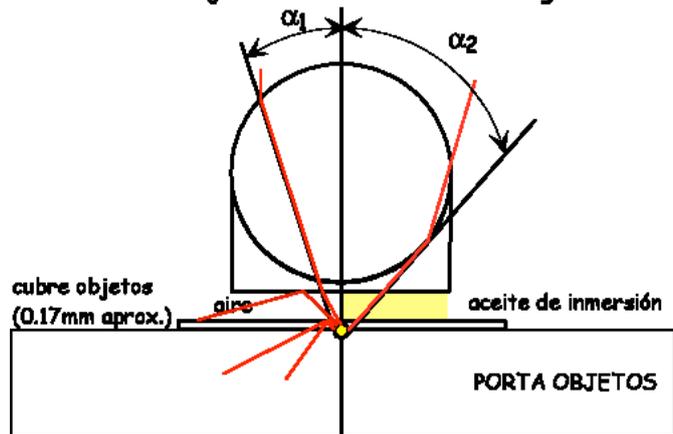
CONDENSADOR

El haz de rayos lumínicos que atraviesa el objeto es el que va a formar la imagen ampliada tras pasar por los sistemas de lentes.

Los rayos que entran en el objetivo van a depender de la apertura numérica de éste.

APERTURA NUMÉRICA: (NA) = sen α . n
 n = índice de refracción del medio entre el cubre (cristal) y el objetivo (cristal):
 aire: n = 1
 aceite de inmersión: n = 1.515 (anillo negro)
 otros:
 agua: n = 1.333 (anillo blanco)
 glicerina: n = 1.455 (anillo naranja)
 yoduro de metileno: n = 1.740 (anillo amarillo)

De los rayos de luz, sólo entran en el objetivo los incluidos en el ángulo α



OCULAR: 10x (OCULAR 16x ENTRE PARENTESIS)

OCULAR	OBJETIVO	AUMENTOS	APERTURA	CAMPO	PROFUNDIDAD	PODER DE	DISTANCIA
COLOR	AUMENTOS	TOTALES	NUMÉRICA	REAL	DE CAMPO	RESOLUCIÓN	DE TRABAJO
rojo	4x	40 (64)	0.1	4.5mm	69.2mm	2.8mm	28mm
amarillo	10x	100 (160)	0.25	1.8mm	10.1mm	1.1mm	8mm
azul	40x	400 (640)	0.65	0.45mm	0.97mm	0.42mm	0.73mm
blanco	100x	1000 (1600)	1.25	0.18mm	0.33mm	0.22mm	0.16mm

Una vez asumida la importancia de la intensidad de la iluminación sobre el objeto, debe analizarse el límite de aumentos que pueden obtenerse con un microscopio.

Si la luz es suficiente, en teoría se podrían colocar sistemas de lentes muy potentes y llegar a los 10.000 aumentos a más, sin embargo la imagen que se observaría aunque grande no sería nítida, el microscopio no permitiría resolver, ver separadamente estructuras más pequeñas de un determinado tamaño. Para obtener una imagen nítida, los aumentos máximos de los diferentes sistemas de lentes están limitados por su **PODER DE RESOLUCIÓN**.

PODER DE RESOLUCIÓN: Distancia mínima a la que pueden estar 2 objetos o estructuras para verse independientemente.

$$\text{poder de resolución} = \text{apertura numérica(NA)} / \text{longitud de onda de la luz } (\lambda) = \text{sen } \alpha \cdot n / \lambda$$

La luz de los microscopios ópticos compuestos normales es la luz visible cuyo espectro se da a continuación junto a otras longitudes de onda.

longitud de onda (en mm) [*]	nombre que recibe la onda
menores que 10 ⁻⁹	rayos gamma
entre 10 ⁻⁹ y 10 ⁻⁵	rayos X
entre 10 ⁻⁵ y 3.8 x 10 ⁻⁴	ondas ultravioletas
entre 3.8 x 10 ⁻⁴ y 7.5 x 10 ⁻⁴	luz visible
entre 7.5 x 10 ⁻⁴ y 10 ⁻¹	ondas infrarrojas
entre 10 ⁻¹ y 10	microondas
entre 10 y 10 ³	ondas de radio (FM)
entre 10 ³ y 10 ⁸	ondas de radio (onda corta)
entre 10 ⁵ y 10 ⁷	ondas de radio (AM)
entre 10 ⁷ y 10 ⁹	otras ondas de radio

Colores puros de la luz visible			
		nm	Å ^o
Violeta		0.46	4600
Azul		0.5	5000
Verde		0.56	5600
Amarillo		0.59	5900
Naranja		0.61	6100
Rojo		0.66	6600

electrones: λ depende del voltaje: 50.000V.: $\lambda = 0.054\text{Å}^o$. 200.000V.: $\lambda = 0.037\text{Å}^o$

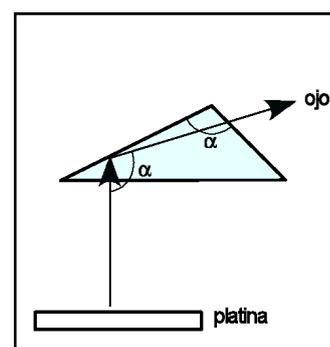
1 mm. (milímetro) = 1.000 μm . (micras) = 1.000.000nm. (nanómetros) = 10.000.000Å^o Amstrongs (armstrongs)

Para completar los elementos ópticos de los microscopios actuales se debe considerar que:

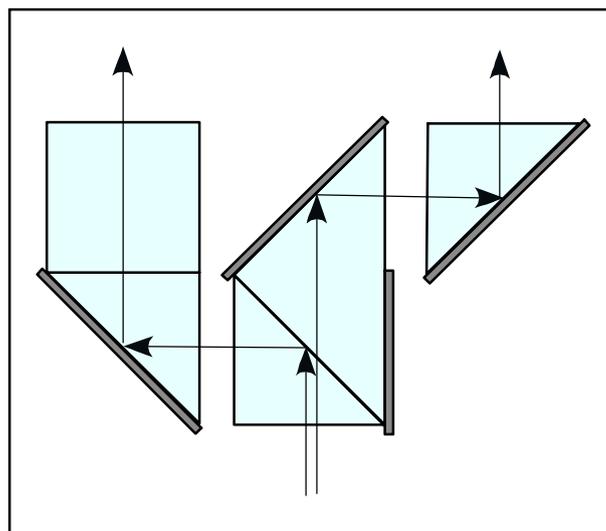
Los microscopios compuestos clásicos tenían un eje óptico recto y eran mono-oculares.



Para dotarlos de mayor comodidad en la observación se intercaló un prisma entre el objetivo y el ocular, que permite una observación angular con la platina horizontal.

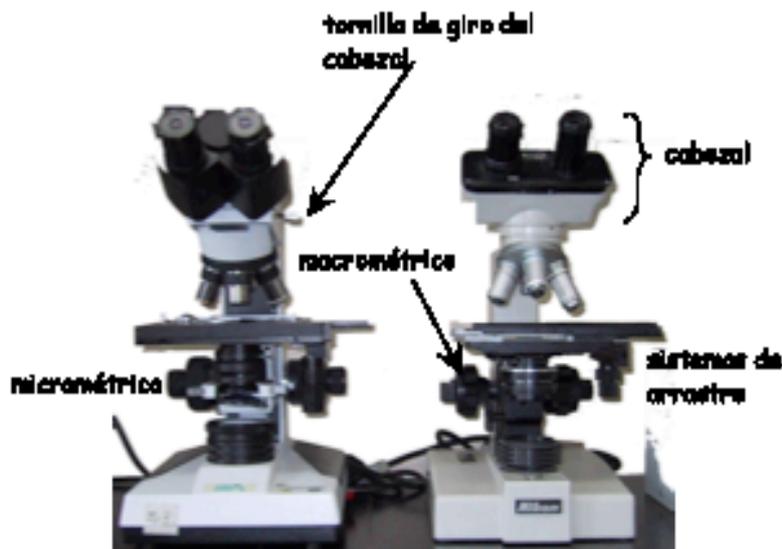
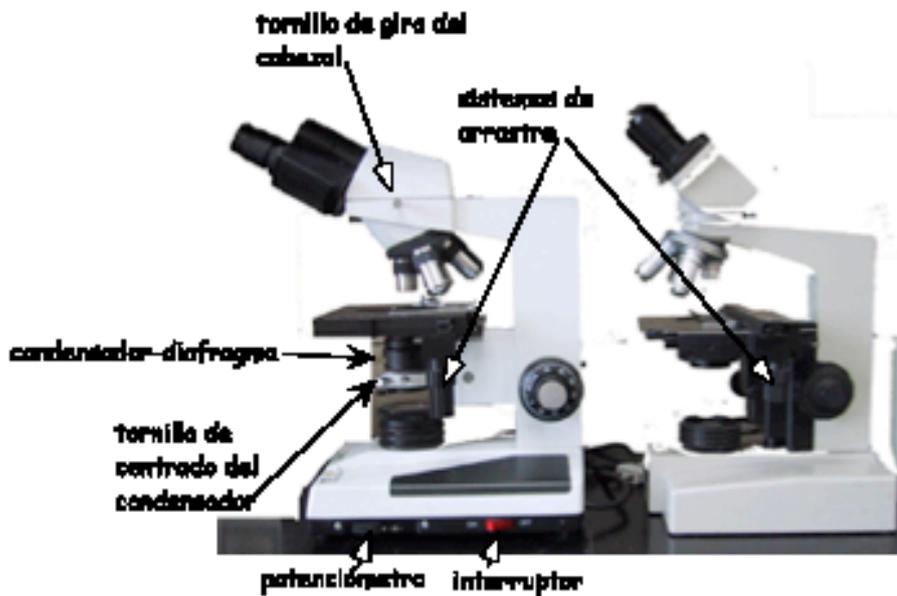
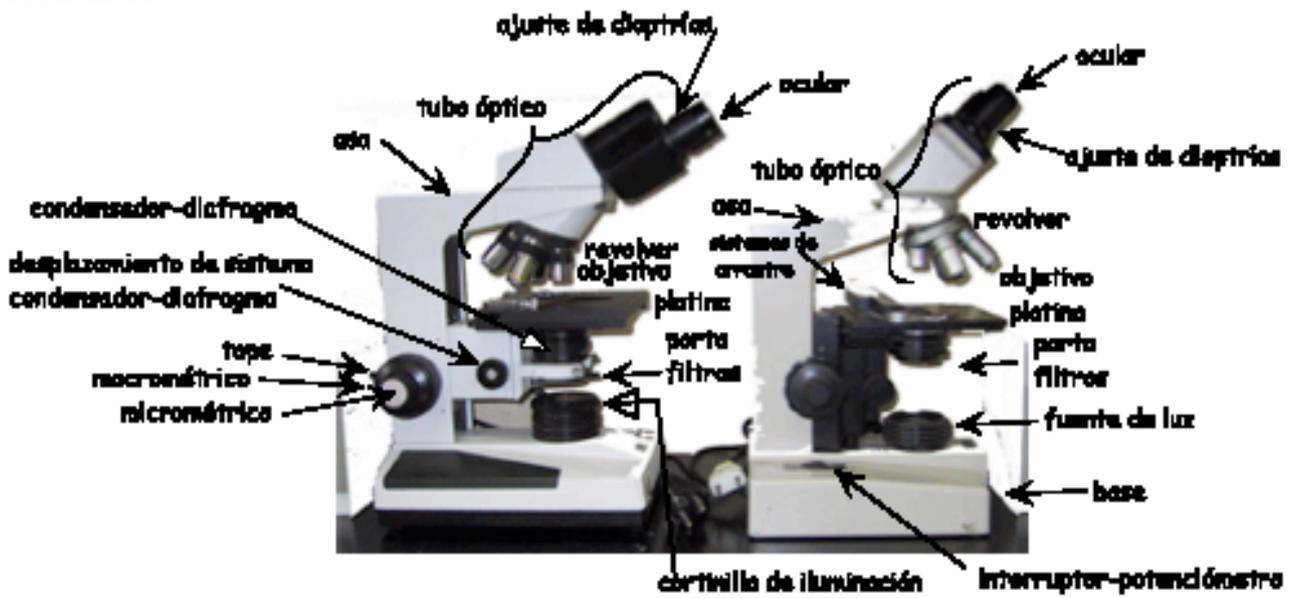


Más adelante y también con prismas se desdobló la imagen para que la observación fuese binocular.



Aunque la observación se hace con los dos ojos, sigue siendo una sola imagen duplicada exactamente por lo que es una imagen plana.

En cuanto a las partes mecánicas del microscopio, se presenta a continuación un esquema con sus nombres.



ILUMINACIÓN KÖHLER:

Al ajustar de la apertura del diafragma de iluminación y la distancia del condensador se eliminan en lo posible la interferencia de los rayos refractados y con ello se consigue una mayor nitidez en la imagen. A este ajuste se le conoce como iluminación Köhler.

- 1.- Enfocar la muestra lo más finamente posible.
- 2.- Cerrar la cortinilla de la fuente de iluminación hasta que su apertura se observe en el campo.
- 3.- Ajustar la distancia del sistema condensador – diafragma hasta que el borde de la cortinilla de la fuente de iluminación se vea con nitidez.
- 4.- Mover los tornillos de ajuste horizontal del sistema condensador diafragma hasta que su eje coincida con el eje óptico del microscopio (la cortinilla de la fuente de iluminación queda concéntrica con el campo de visión).
- 5.- Abrir la cortinilla de la fuente e iluminación hasta que desaparezca del campo de visión.
- 6.- Ajustar la apertura del diafragma cerrando hasta evitar la difuminación de la imagen producida por la reflexión de la luz.

UTILIZACIÓN DEL MICROSCOPIO:

- 1.- Conectar a la red.
- 2.- Girar el revolver hasta colocar el objetivo de menor aumento (4x).
- 3.- Encender el interruptor y ajustar la iluminación hasta que se vea el haz de luz.
- 4.- Colocar la preparación encajándola en la escuadra y sujetándola con la pinza.
- 5.- Mover los sistemas de arrastre hasta colocar sobre el haz de luz la zona que se desea observar.
- 6.- Girar el tornillo macrométrico elevando la platina con la preparación hasta el tope superior.
- 7.- Para empezar la observación lo primero es ajustar la distancia inter-pupilar (separación de los oculares hasta que se observe un solo campo circular).
- 8.- Mirando por los oculares mover lentamente el tornillo macrométrico haciendo descender la platina hasta que se enfoque la preparación (la muestra se observa nítidamente en el campo).
- 9.- Ajustar la visión de los dos oculares: a) cerrando el ojo izquierdo, se enfoca la imagen en lo posible. b) cerrando el ojo derecho mover el ajuste de dioptrías del ocular izquierdo hasta que la imagen se observe enfocada.
- 10.- Efectuar un ajuste de iluminación (iluminación köhler). (Aunque puede ser conveniente, no es necesario repetir esta operación cada vez que se cambia de objetivo).
- 11.- Moviendo los sistemas de arrastre con la mano derecha y el tornillo micrométrico con la izquierda, buscar y observar la muestra.
- 12.- Para pasar al objetivo siguiente (10x) colocar la zona que se quiere observar en el centro del campo, comprobar que está bien enfocada y girar el revolver hasta colocar el objetivo deseado. En el campo aparecerá una imagen borrosa que se enfoca con ligeros movimientos del tornillo micrométrico.
- 13.- Repetir el punto 11 y la mecánica del 12 para pasar de 10 a 40 aumentos de objetivo.
- 14.- Al ser de aceite de inmersión el objetivo de 100 aumentos, para pasar de 40 a 100 se modifica ligeramente el modo de actuación:
 - Centrar la imagen que desea observarse con el objetivo de inmersión y enfocar perfectamente.
 - Girar el revolver ligeramente hasta que el campo de la preparación quede entre los dos objetivos (40x y 100x).
 - Colocar una pequeña gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos de la preparación y justamente en el campo iluminado que se desea observar.
 - Girar el revolver hasta colocar en posición el objetivo de inmersión (100x).
 - Observar; en el campo aparecerá una imagen borrosa que enfoca con ligeros movimientos del tornillo micrométrico
 - Moviendo los sistemas de arrastre con la mano derecha y el tornillo micrométrico con la izquierda, buscar y observar la muestra.
 - Evitar en todo momento el paso del objetivo 40x por la zona de la preparación en que se encuentra el aceite de inmersión.
 - Una vez finalizada la observación, colocar el objetivo de menor aumento (4x), limpiar con un papel suave el objetivo de inmersión, retirar la preparación y apagar el microscopio.

Nota: Siempre que no se esté utilizando, el microscopio debe estar apagado.

TOMA DE COORDENADAS

Al observar una muestra es frecuente que se desee apuntar o fijar la situación de un punto o estructura concreta de la muestra para poder volver sobre ella con precisión después de explorar otras zonas. Por ello los microscopios están dotados de un sistema de coordenadas cartesianas (bidimensionales, con abscisas, x ó derecha e izquierda del observador y ordenadas, y ó delante y detrás de observador).

Los sistemas de coordenadas van asociados a los sistemas de arrastre de la platina (escuadra y pinza) y están dotados de regletas milimetradas en las que los números de las abscisas y ordenadas no son coincidentes para evitar equivocaciones.

Los puntos de coordenadas los marca el cero o inicio de una reglilla secundaria (nonius o vernier) que además permite afinar hasta la décima de milímetro.

Cada punto de la preparación queda así definido por dos números, sobre los que se puede volver cuando se desee.

Para que la toma de coordenadas sea efectiva deben seguirse los siguientes pasos.

- Verificar que la muestra está perfectamente encajada en los sistemas de arrastre.
- Verificar y apuntar si es necesario la orientación de la preparación (identificador de la preparación a la derecha o a la izquierda).
- Centrar en lo posible en el campo el punto de interés con el objetivo de mayor aumento posible.
- Apuntar las coordenadas.

Cuando se desee volver a observar el punto de interés del que se han tomado las coordenadas deben seguirse los siguientes pasos.

- Si se ha cambiado de preparación, verificar que la muestra está perfectamente encajada en los sistemas de arrastre y que su orientación es la misma que tenía cuando se tomaron las coordenadas.
- Colocar un objetivo de menor aumento a aquel con el que se tomaron las coordenadas (se trata de superar los desfases debidos a pequeños errores que se pueden cometer en el proceso).
- Mover los sistemas de arrastre hasta colocarlos en las coordenadas apuntadas.
- Observar e identificar la estructura.

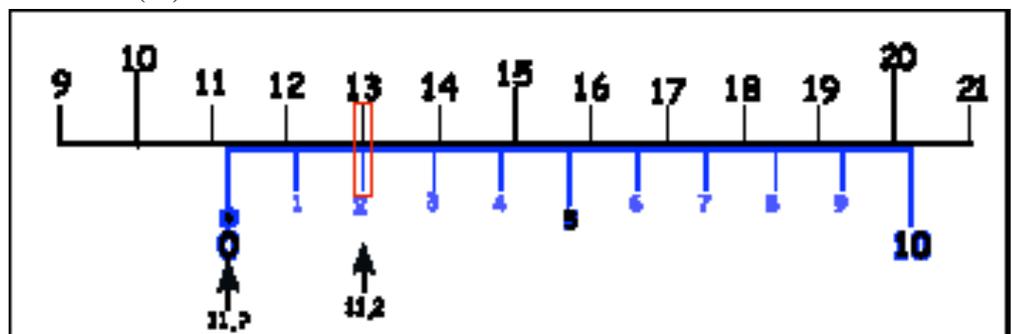
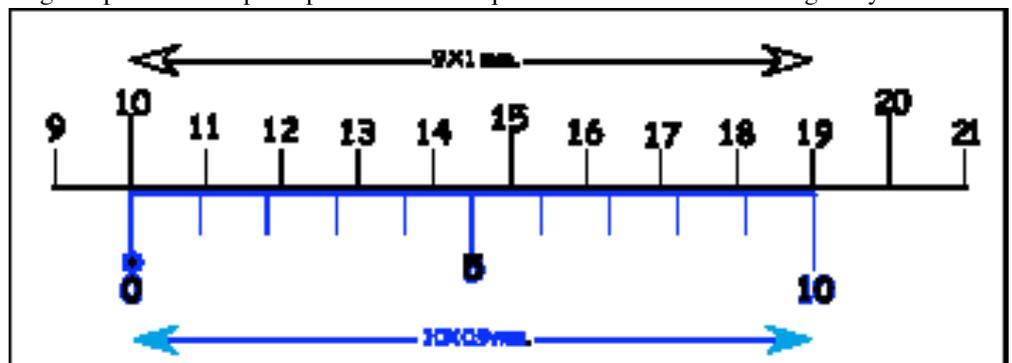
FUNDAMENTO Y UTILIZACIÓN DEL NONIUS O VERNIER.

El nonius consiste en una reglilla paralela a la principal milimetrada que tiene 9 milímetros de longitud y está dividida en 10 segmentos iguales cada uno de los cuales tendrá 0.9 mm. El nonius es deslizante y el 0 marca la longitud (en el caso del microscopio es la coordenada, abscisa u ordenada del punto del plano que se está observando).

Cuando el 0 no coincide exactamente con una de las líneas de los milímetros, las décimas que se sobrepasan serán las mismas que el número de divisiones del nonius que hay entre el 0 y la primera raya que coincida con una de las de la regla milimetrada. Véase un ejemplo:

El cero del nonius marca un número (11) + X décimas de milímetro. Como cada división del nonius tiene una

décima de milímetro menos que la regleta milimetrada, cada raya del nonius se irá acercando a la correspondiente de la milimetrada una décima y coincidirán cuando el número de divisiones del nonius sean las mismas que las décimas en que 0 sobrepase el número de los milímetros.



Nota: las coordenadas de un microscopio no son trasladables a otros por lo que cuando es necesario cambiar de microscopio lo más fácil es marcar físicamente con un rotulador el entorno de la zona que se desea observar, siempre que no se utilice aceite de inmersión, y siguiendo los siguientes pasos.

- Centrar la estructura con objetivo de mayor aumento posible (40x)
- Girar el revolver hasta una posición intermedia entre dos objetivos.
- Cerrar la cortinilla de la iluminación hasta que el campo iluminado sea mínimo.
- Marcar con el rotulador (un solo punto es suficiente) en el borde de la zona iluminada.
- Comprobar con el objetivo 10x que se ve bien lo que se quiere observar y la marca de rotulador (hacer un pequeño esquema si es necesario).

En el otro microscopio se busca la marca de rotulador y a partir de ella se localiza la estructura

