

3. INSTRUMENTOS ÓPTICOS

La variedad disponible de instrumentos ópticos es inmensa, de configuración muy variada y de prestaciones muy diversas. La perfección de las técnicas de producción de lentes ha aumentado considerablemente las posibilidades y prestaciones de los instrumentos ópticos. Desde las gafas más o menos sofisticadas, con variación continua de distancias focales, hasta los telescopios más avanzados, pasando por todo tipo de prismáticos y lentes simples, el mercado ofrece una amplia variedad.

Para las necesidades de este texto, se parte de los instrumentos simples (como la lupa) hasta llegar a describir el diseño y el funcionamiento del llamado microscopio compuesto, base de la mayoría de microscopios ópticos utilizados normalmente en los estudios de óptica cristalina.

3.1. El ojo

Es el principal instrumento óptico, puesto que cualquier imagen que se pretenda “ver” debe pasar por su formación a través de los ojos del observador. Por otra parte, la anatomía del ojo lo convierte realmente en un sistema óptico que funciona con los parámetros descritos para los sistemas en general.

En realidad, el ojo humano es un instrumento muy simple desde el punto de vista óptico: consiste en una lente convergente, el cristalino, que forma las imágenes en la retina. Para adaptar el enfoque de las imágenes siempre en el mismo sitio, el ojo modifica la curvatura del cristalino mediante unos diminutos músculos, lo que equivale a modificar la potencia de la lente, para formar sobre la retina imágenes de objetos situados a diversas distancias.

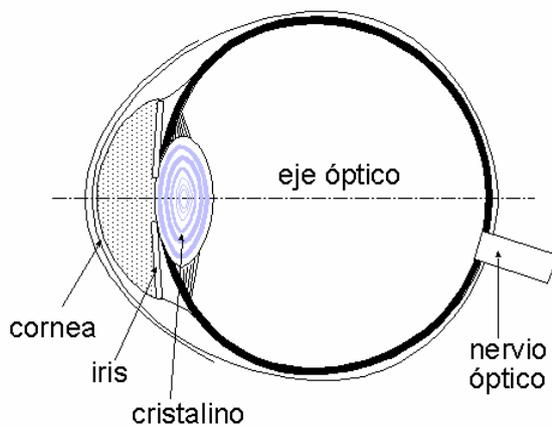


Figure 1

La musculatura que modifica la geometría del cristalino está relajada en la posición de enfoque al infinito. Hay que en cuenta este hecho cuando se disponga el ajuste del microscopio, dado que el operador puede llegar a trabajar un elevado número de horas conviene que la imagen se forme en el infinito para que su observación se realice en condiciones de relajación de la musculatura del ojo.

Otro dato interesante es la mínima distancia a la cual el ojo es capaz de enfocar, que se conoce como *punto próximo*. En un ojo adulto sano esta distancia está alrededor de los 25cm, con ligeras variaciones de un individuo a otro. El enfoque en el punto próximo implica la contracción completa de los músculos que modifican el cristalino. El incremento de esta distancia debido a envejecimiento de la musculatura, o a otro tipo de problemas, es lo que se conoce coloquialmente como “vista cansada” o hipermetropía: en el ojo hipermetrope la distancia mínima de enfoque es superior a 25cm, lo que conlleva, por ejemplo, leer separando mucho el libro del ojo. Por el contrario, la miopía significa que esta distancia mínima es inferior a la “normal”, lo que suele llevar asociado que con el ojo relajado el plano de enfoque no está en el infinito, sino a una distancia más o menos corta; por este motivo el individuo miope no ve de lejos y debe acercarse mucho un libro para leerlo.

3.2. La lupa

Es el instrumento óptico más simple, las lupas de pocos aumentos consisten en una sola lente, normalmente delgada puesto

que las aberraciones cromáticas no son importantes. Para lupas de más aumentos se requiere un sistema óptico formado por diversas lentes acopladas, de modo que unas corrijan las aberraciones ocasionadas por las otras y el conjunto funcione adecuadamente. En estas condiciones, la lupa es un sistema óptico convergente con una distancia focal pequeña.

A efectos prácticos se puede trabajar como si los dos planos principales coincidieran en uno solo. Sobre un esquema como el de la Figura 2, es posible trazar las trayectorias de los rayos para formar la imagen de un objeto situado sobre el foco objeto f_1 .

Cuando el objeto está sobre el foco objeto, la imagen es virtual y se forma en el infinito, y el observador la ve bajo un ángulo φ_2 . Si

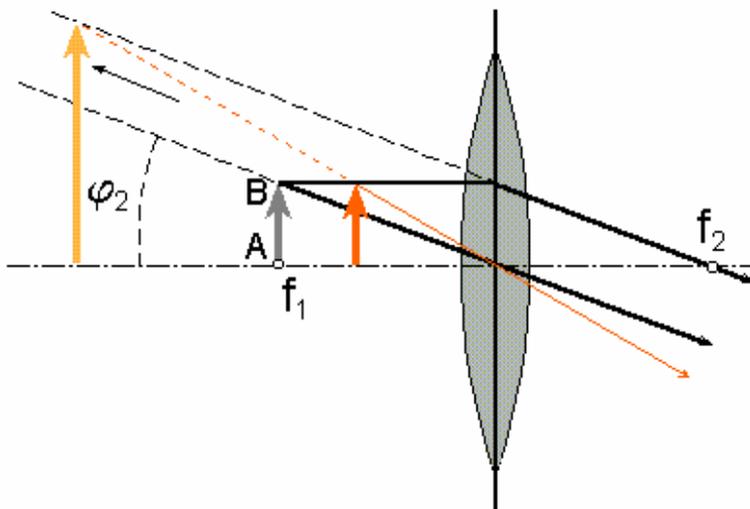


Figura 2

se acerca el objeto a la lupa (flecha naranja), la imagen sigue siendo virtual, pero no se forma en el infinito, siendo el límite de observación aquel en que la imagen se forme a 25cm del observador. Para distancias menores, no se puede enfocar por las limitaciones del ojo. En todo caso, el ángulo bajo el cual se observa la imagen no aumenta, por lo tanto es

conveniente situar el objeto en el foco para que el ojo observe la imagen en posición de relajación. Si el objeto se situa más lejos del foco, la imagen que se forma es real, y la lupa no trabaja como tal, sino como un objetivo de proyección.

Situando el objeto en el foco, el aumento comercial de la lupa

es

$$AC = \frac{\text{tag}j_2}{\text{tag}j_1} = \frac{AB/f_1}{AB/d} = \frac{d}{f_1},$$

donde d es la distancia del punto próximo (aproximadamente 25cm).

Siendo d prácticamente una constante, el aumento de una lupa depende de su distancia focal, de modo que cuanto menor sea ésta, mayor es el aumento del sistema. Las mejores lupas tienen una distancia focal de alrededor de un centímetro, lo cual limita el aumento comercial máximo a 25. Las lupas de distancias focales pequeñas suelen presentar problemas de aberraciones, por tanto para observaciones a más aumentos se requiere el empleo de otro instrumento óptico: el microscopio.

3.3. El microscopio compuesto

Para aumentos comerciales superiores a 30x y hasta unos 1500x o 2000x se utiliza el microscopio, que básicamente consiste en dos sistemas ópticos: el *objetivo* y el *ocular*, ambos convergentes alineados sobre un eje. El objetivo es un sistema que produce una imagen del objeto en el plano focal del ocular, que a su vez produce una imagen virtual en el infinito. En todos los microscopios existe, además de éstos, un tercer sistema óptico que ilumina el objeto, llamado *condensador*, aunque para describir el funcionamiento del microscopio se puede prescindir de él y suponer el objeto correctamente iluminado.

Para observar el objeto A, de longitud l , hay que colocarlo a una distancia del objetivo tal que se forme la imagen invertida A' sobre el plano focal objeto del ocular. Sobre esta imagen, el ocular actúa como

una lupa y forma una imagen virtual, derecha, en el infinito (Figura 3). En estas condiciones, el ojo trabaja enfocando al infinito, por tanto en posición relajada, y observa una imagen invertida respecto del objeto.

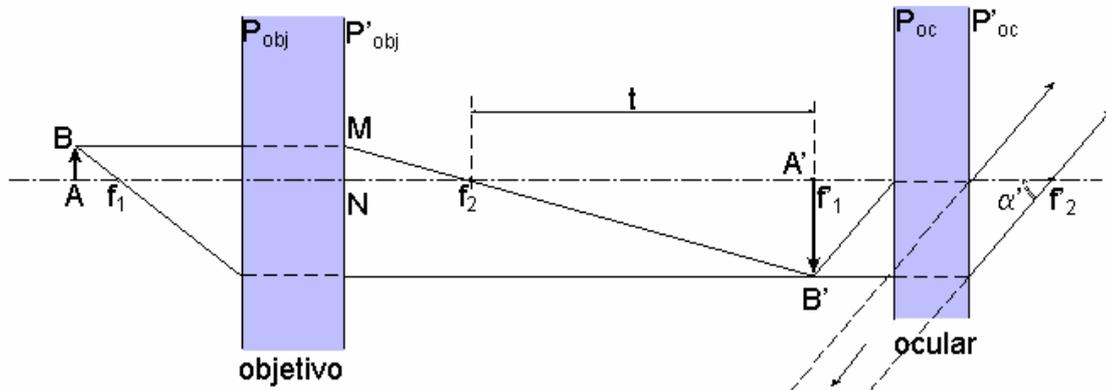


Figura 3

El aumento comercial del microscopio es

$$AC = \frac{\text{tag} \mathbf{j}_2}{\text{tag} \mathbf{j}_1} = \frac{l'/f'_1}{l/d} = \frac{d}{f'_1} \cdot \frac{l'}{l}$$

es decir, que el aumento total del microscopio es igual al producto del aumento comercial del ocular (d/f'_1) por el aumento lateral del objetivo (l'/l). Como el ocular opera como una lupa, sus aumentos están limitados a aproximadamente 20x, aunque es conveniente utilizar oculares de menos aumentos (entre 8x y 12x), porque los de mayores aumentos suelen presentar una fuerte absorción de la luz y reducen la luminosidad de la imagen. Es decir que, como norma general, si se precisa incrementar los aumentos, hay que cambiar el objetivo, jamás el ocular.

En la Figura 3, los triángulos MNf_2 y $A'B'f_2$ son semejantes, y considerando que el segmento MN es igual a la longitud l del objeto, se puede escribir que

$$\frac{l}{l'} = -\frac{t}{f_2}$$

el signo menos aparece al considerar que MN está por encima del eje, y $A'B'$ por debajo, según la convención de signos, lo que significa que la imagen $A'B'$ está invertida. La distancia t entre el punto focal imagen del objetivo f_2 y el punto focal objeto del ocular f'_1 , se denomina *longitud óptica* del tubo del microscopio..

Por lo tanto, el aumento total del microscopio es

$$AC_M = -\frac{d}{f'_1} \cdot \frac{t}{f_2}$$

La resolución del microscopio viene dada por la resolución de su objetivo, puesto que si éste no es capaz de separar claramente dos puntos muy próximos, tampoco podrá resolverlos el ocular. La expresión de este límite de resolución, obtenida empíricamente, viene dada por la expresión

$$d = \frac{0.61 \cdot \lambda}{an}$$

O sea, que si se desea aumentar la resolución de un microscopio, o se disminuye la longitud de onda de la luz que ilumina, o se aumenta la apertura numérica del objetivo. En un microscopio óptico, normalmente trabajando en la zona visible del espectro o en regiones cercanas (UV o IR), la disminución de la longitud de onda no aumenta significativamente la resolución y crea problemas importantes de transformación de la imagen cuando se trabaja fuera del espectro visible (UV o IR). Fuera del campo de la microscopía óptica, la resolución mejora claramente utilizando la radiación

asociada a un haz acelerado de electrones, que constituye la base de la microscopía electrónica

Por tanto, el procedimiento más efectivo para mejorar la resolución del microscopio es utilizar un objetivo de mayor apertura numérica, por ejemplo un objetivo de inmersión en aceite. Existen objetivos de este tipo cuya apertura numérica llega a ser 1.5, lo que significa un semiángulo (una apertura angular) cercano a los 90°. En estas condiciones experimentales, y suponiendo una longitud de onda promedio del visible de 500nm, el límite de resolución llegará a ser

$$d = \frac{0.61 \cdot 500}{1.5} = 200nm$$

es decir, que el segmento más pequeño que se puede llegar a resolver con un microscopio óptico es de 200nm, en las mejores condiciones.

Para que el ojo trabaje relajado y en condiciones de observación adecuadas, un objeto ha de ser visto, al menos, bajo un ángulo de tres minutos (3'). Por lo tanto, siendo el aumento lateral del objetivo AL_{ob} , el segmento δ se verá en el plano focal del ocular como δ'

$$d' = AL_{ob} \cdot 2 \cdot 10^{-4} mm$$

que para que sea visto, al menos, bajo un ángulo de 3'

$$3' \approx 0.0009 rad = \frac{d'}{f_1'} = \frac{AL_{ob} \cdot 2 \cdot 10^{-4}}{f_1'}$$

despejando el aumento lateral del objetivo AL_{ob} y substituyéndolo en la expresión del aumento total del microscopio, éste queda

$$AC_M = \frac{0.0009 \cdot f_1'}{2 \cdot 10^{-4}} \cdot \frac{250}{f_1'} \approx 1200$$

es decir, que el aumento máximo de un microscopio óptico está algo por debajo de los 1500 aumentos.

A partir de los datos calculados en este apartado, un microscopio óptico puede llevar a resolver segmentos de alrededor de la quinta parte de la micra, y aumentar un objeto hasta alrededor de 1500 veces. Hay que hacer notar que estas cifras son indicativas, y por tanto no pueden ser consideradas como cantidades exactas, sino como órdenes de magnitud que indican hasta qué límites se puede utilizar el microscopio óptico. Dicho de otro modo, tratar de alcanzar los 4000 aumentos con un microscopio óptico esta, a todas luces, fuera del alcance del equipo, y lo mismo se puede decir si se pretende ver una estructura formada por elementos de alrededor de 100nm. Con toda seguridad el microscopio óptico no es el instrumento adecuado, y habría que abordar la cuestión con algún otro tipo de instrumentación que disponga de las prestaciones requeridas.

Partes del microscopio

Hasta aquí se ha descrito el microscopio desde un punto de vista un tanto teórico, sólo a partir de los sistemas ópticos que sirven para la formación de la imagen que se va a observar. En este apartado se pretende describir los componentes que forman el microscopio y su uso. A grandes rasgos hay que diferenciar las partes constituidas por sistemas ópticos, de otras estrictamente mecánicas que facilitan el manejo de los sistemas ópticos. Hay que señalar que la descripción de las partes del microscopio que se hace aquí corresponde a un equipo de microscopía de transmisión, es decir, un microscopio en que la muestra se observa mediante la luz que la atraviesa. Posteriormente se describirán específicamente los componentes de un microscopio de reflexión y sus diferencias y similitudes con el microscopio de transmisión.

Componentes mecánicos

Los componentes mecánicos varían bastante de unos modelos a otros y entre fabricantes, pero existen unos mínimos comunes a todos ellos. Todos los microscopios tienen una estructura, normalmente metálica, y que sirve de soporte a todo el conjunto de componentes que, desde el punto de vista estético, es la que da forma externa al equipo: es lo que se conoce como *estativo*. Mecánicamente no es otra cosa que el soporte de todo el conjunto, y no cumple otra función que ésta. En alguna parte del estativo, variando de unos modelos a otros, suele haber la lámpara de iluminación y a veces, una parte del sistema electrónico de control de la alimentación de la misma.

El elemento mecánico esencial es el *tubo* del microscopio, denominado de esta manera porque en los modelos más antiguos era realmente un tubo, en cuyo extremo superior se alojaba el ocular, mientras que el inferior soportaba el objetivo. Su eje central coincide con el eje de los sistemas ópticos que forman el microscopio.

Modernamente el tubo ha perdido en gran parte la forma rectilínea y por razones ergonómicas, suele tener forma de codo, de tal manera que el ocular queda inclinado hacia la posición de observación del operador. Esta forma requiere un prisma intermedio que desvie la luz hacia el ocular, al mismo tiempo, si se trabaja con luz polarizada, es conveniente que ésta llegue al prisma con el plano de polarización perpendicular al plano de incidencia en el prisma, a fin de evitar polarización elíptica. Normalmente esta posición se obtiene con el plano de polarización de izquierda a derecha.



Figura 4: Modelo antiguo de microscopio de polarización

En el extremo superior del tubo existe un alojamiento para el ocular, mientras que en la parte inferior suele encontrarse el

sistema de intercambio de objetivos, frecuentemente un revolver con cuatro o cinco anillos portaobjetivos, aunque otros modelos disponen de un sistema de intercambio mediante bayoneta.

La muestra se coloca sobre una base plana, denominada *platina*, que tiene un orificio central que permite el paso de la luz. Algunos modelos de platina permiten un desplazamiento ortogonal de la muestra. La platina dispone de un sistema de cremallera que facilita su desplazamiento vertical a lo largo del eje del microscopio a fin de situar la muestra a la distancia adecuada de la lente frontal del objetivo para que se forme la imagen en el plano focal del ocular.

En casi todos los modelos, el sistema de cremallera dispone de un tambor para el avance fino y otro para el grueso, que se denominan *tornillos de enfoque micrométrico y macrométrico*, respectivamente. Además, en algunos modelos el tambor del sistema de enfoque micrométrico está dotado de una escala graduada que permite medir el desplazamiento vertical, normalmente con una precisión de $\pm 1\text{mm}$. En algunos modelos antiguos el sistema de enfoque trabaja sobre el tubo, aunque pocos microscopios modernos conservan esta disposición por el desgaste que significa para la cremallera soportar el peso del tubo y sus componentes.

Solidario con la platina, y ubicado en la parte inferior de la misma está el sorporte del sistema óptico del condensador, cuya función es iluminar adecuadamente la muestra. En la mayoría de microscopios el condensador dispone de un sistema de cremallera que facilita su desplazamiento a lo largo del eje óptico, a la vez que dispone de uno o varios alojamientos para filtros y uno o dos diafragmas iris con distintas funciones.

En los microscopios de polarización, la platina es rotatoria

concéntricamente con el eje del microscopio, y en estos casos, los ejes de giro de la platina y los ópticos del objetivo y ocular deben estar perfectamente alineados, lo que requiere un sistema de centraje del microscopio que permita alinear uno de ellos respecto los otros dos. Según los fabricantes, el sistema de centraje actúa sobre la platina o sobre los objetivos. Más adelante se verá con detalle cómo centrar el microscopio.

Condensador

Los objetos a observar en microscopía no son, por lo general, luminosos y por tanto requieren ser iluminados mediante un sistema que garantice una correcta distribución de la luz en la superficie de la muestra. Si se colocara una simple bombilla que repartiera la luz esféricamente, la cantidad de luz que se aprovecharía para iluminar el objeto sería mínima y el rendimiento luminoso bajísimo. Es preciso utilizar un colector de luz que la dirija de un modo eficiente sobre la muestra. Esto se consigue con un sistema óptico situado entre la muestra y la fuente luminosa, que se denomina *condensador*.

El sistema de iluminación de los microscopios actuales suele constar de una bombilla halógena de bajo voltaje (6V o 12 V) y de potencia variable de unos modelos a otros, desde 25W hasta 100W o 150W para aplicaciones especiales. En todos los casos, el portalámparas incorpora un reflector ubicado tras la bombilla para mejorar su rendimiento lumínico, y un difusor (un vidrio esmerilado) que garantiza la buena difusión de la luz e impide que el filamento de la lámpara se vea superpuesto a la imagen. Casi siempre hay, además, filtros anticalóricos que cortan la radiación infraroja de la lámpara para evitar el calentamiento de las lentes del condensador y de la

muestra durante la observación.

Existen dos tipos fundamentales de condensador, el denominado de iluminación crítica y el de iluminación de Köhler.

Iluminación crítica

En este sistema una lente convergente L reproduce la imagen del difusor de la fuente de iluminación S sobre el plano de la platina, donde se forma una imagen real e invertida S' (Figura 6). Si sobre el difusor existe un diafragma iris (DC), éste limita la zona iluminada de la muestra al reproducirse sobre ella su imagen por la lente L, de tal modo que actúa como *diafragma de campo*. En este caso se trata de un diafragma que limita el campo de observación.

La mayoría de condensadores incorporan otro diafragma iris cerca de la lente (DA) cuya acción limita la apertura angular del sistema óptico del condensador, por lo que recibe el nombre de *diafragma de apertura*.

El efecto visual que produce es de disminución de la luminosidad de la imagen final porque limita el acceso de luz a la muestra, aunque hay que recordar que también modifica la apertura numérica del condensador.

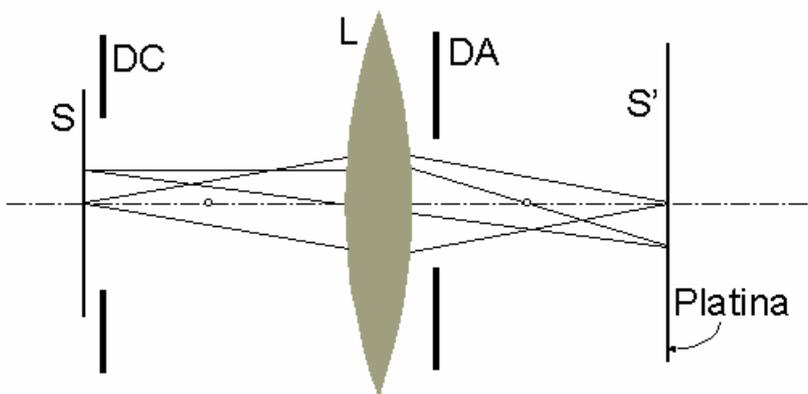


Figura 6

Iluminación de Köhler

En este caso el condensador consta de dos lentes L_1 y L_2 , la primera reproduce la imagen del difusor de la lámpara sobre el plano focal objeto de la segunda, a la vez que ésta reproduce la imagen en

el infinito, paralelamente al eje del sistema (Figura 7). Así se consigue que llegue a la muestra un haz de rayos paralelos al eje del microscopio.

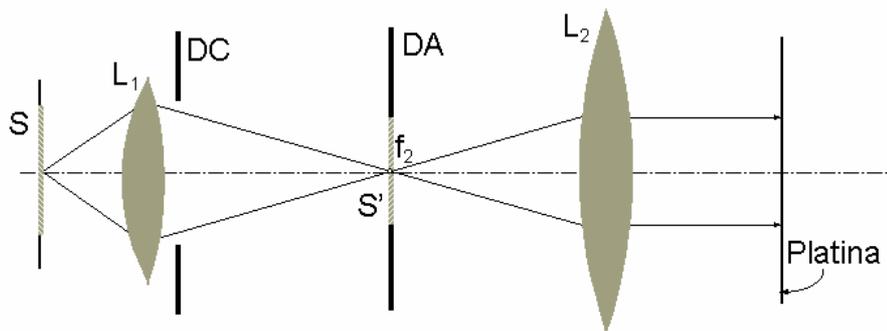


Figura 7

Junto a la lente L_1 se ubica un diafragma iris DC, en una posición tal que su imagen se forma sobre el plano de la platina (sobre la muestra) y limita la zona iluminada de ésta, y por lo tanto, actúa como

diafragma de campo. En el plano focal objeto de la segunda lente L_2 otro diafragma iris limita el número de puntos de la imagen del difusor que contribuyen a la iluminación de la muestra, y por tanto actúa como diafragma de apertura.

Objetivos

El objetivo es la pieza fundamental del microscopio y su fabricación requiere una esmerada corrección de las aberraciones y una elevada precisión en sus características ópticas. Aunque se ha citado como “una lente”, lo cierto es que se trata de sistemas de lentes bastante complejos, frecuentemente adaptados a necesidades específicas, con corrección selectiva de algunas aberraciones o con formación de una imagen plana o no, según los casos, a veces con tratamiento anirreflectante de la lente frontal, etc.

De modo coloquial los objetivos se suelen clasificar baja, media y alta potencia, según sus aumentos. Las características técnicas suelen estar grabadas, en la mayoría de marcas comerciales,

en su montura, siguiendo un esquema predeterminado. Así, un objetivo puede llevar grabadas las siguientes indicaciones

40/0.65

160/0.17

cuyo significado es:

aumento lateral / apertura numérica

distancia mecánica del tubo (mm) / distancia de trabajo (mm)

en objetivos de inferior número de aumentos, la distancia de trabajo no suele estar indicada (en la inscripción correspondiente se indica un guión) porque no tiene mayor importancia. Pero en objetivos de elevados aumentos, en los que la distancia de trabajo es necesariamente pequeña, hay que indicarla para que el espesor del cubreobjetos no sea superior a la misma, en cuyo caso el objetivo jamás llegaría a enfocar la preparación a través de un vidrio más grueso que su distancia de trabajo.

Otras características específicas del objetivo suelen estar grabadas en la montura, como es el caso de objetivos para inmersión en que se indica el medio de inmersión para el que han estado calculados (aceite, agua o glicerina, per ejemplo); u objetivos para técnicas especiales como campo oscuro (frecuentemente indicado como DF, *dark field*), etc. En general, las denominaciones no son exactamente coincidentes entre fabricantes, por lo que se recomienda acudir a los respetivos catálogos para un mayor detalle, en cada caso.

Oculares

Actúan como una lupa para la observación de la imagen real producida por el objetivo y, desde el punto de vista óptico, se trata de sistemas relativamente simples, sobre todo si se comparan con los objetivos. En general los oculares suelen estar corregidos de

aberraciones cromáticas, pero existen algunos, llamados de compensación, que están calculados para realizar la corrección de la aberración producida por objetivos especiales que no la corrigen.

Generalmente los oculares están formados por dos lentes, cuya disposición varía de unos a otros. Los dos tipos de oculares más comunes son los denominados de Huygens y de Ramsden, cuyo esquema se puede ver en la Figura 8.

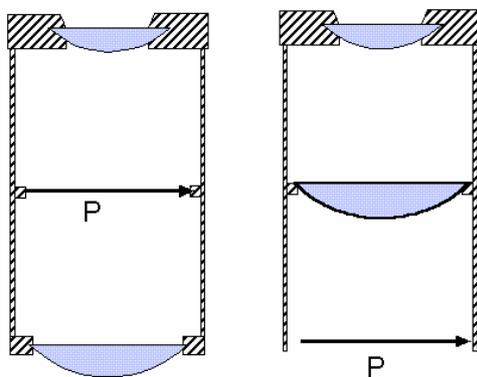


Figura 8

En el ocular de Huygens (Figura 8 izquierda) la imagen producida por el objetivo se sitúa en el interior de la montura del ocular, entre ambas lentes. Técnicamente la primera de las lentes formaría parte del sistema óptico del objetivo. Esta imagen es aumentada por la segunda de las lentes para dar lugar a la imagen virtual que ve el observador.

En el ocular de Ramsden (Figura 8 derecha) la imagen se forma en el tubo del microscopio, antes de la primera de las lentes del ocular. En este ocular ambas lentes actúan como un sistema de lupa para la imagen del objetivo.

Generalmente los oculares llevan gravadas en su parte frontal algunas de sus características, especialmente el aumento comercial en forma de un número seguido de una x (8x, o 10x, por ejemplo). Existen oculares diseñados para ser utilizados con gafas, en los que la pupila de salida está más alejada, esta característica suele estar indicada con el icono de unas gafas. Conviene que las personas que usan normalmente gafas, sepan que la óptica del microscopio corrige, mediante el enfoque adecuado, los posibles defectos de miopía o hipermetropía, pero no el astigmatismo, que implica cierta

deformación de la imagen.

Algunos modelos de microscopio disponen de dos oculares para una observación más cómoda, pero esto no significa que dispongan de visión estereoscópica, puesto que a través de los dos oculares se observa exactamente la misma imagen, ya que hay un solo objetivo y un prisma desdoblador divide la luz entre ambos oculares. Estos equipos permiten ajustar la distancia interpupilar entre los ejes de los oculares a la del operador. A partir de esta distancia hay que ajustar las posiciones de enfoque de los dos oculares.

Los aumentos de los oculares son diversos, pero al actuar a modo de lupa sobre la imagen real producida por el objetivo, no se puede sobrepasar los 25x, tal como se ha demostrado anteriormente. En general, hay que recordar que es conveniente incrementar el aumento total del microscopio mediante el uso de un objetivo adecuado, nunca mediante oculares de mayores aumentos. La fabricación de sistemas oculares de aumentos superiores a 15 o 20 implica una elevada complejidad en la corrección de aberraciones, y en todo caso, son de limitada luminosidad. Para los trabajos convencionales, aumentos de los oculares entre 6 y 12x deben ser considerados adecuados.

3.4. El microscopio de polarización (luz transmitida)

En los trabajos de óptica cristalina, Mineralogía y Petrología, entre otros, es preciso emplear luz polarizada para provocar y analizar diversos fenómenos ópticos entre la luz y las muestras cristalinas a estudiar. Para esto se utilizan los llamados *microscopios de polarización*, se trata de equipos específicamente diseñados para trabajar con luz polarizada y que constan de los mismos sistemas ópticos y mecánicos que el microscopio convencional, con algunos

componentes añadidos que se describirán seguidamente. De modo genérico, la óptica de estos microscopios debe estar exenta de tensiones, para evitar polarización adicional de la luz.

3.4.1. Polarizadores

Obviamente este tipo de microscopía debe incorporar los elementos de polarización de la luz, que en los microscopios de rutina son filtros polarizadores. Uno polariza la luz que llega al objeto, es el llamado *polarizador* y se ubica en el condensador; el otro se dispone en alguna parte del tubo del microscopio, en los tubos acodados por encima del prisma de desviación de la luz, y debe ser intercalable a voluntad del operador: se le denomina *analizador* porque con él se analiza la luz que ha atravesado la muestra. En los equipos de microscopía más sofisticados ambos polarizadores pueden girar sobre un tambor graduado con un nonius para mediciones precisas del ángulo de polarización.

3.4.2. Condensador

El sistema de iluminación es convencional, pero el condensador incorpora una lente adicional abatible en su parte frontal. La intercalación de esta lente en el camino de la iluminación provoca un cono de luz con el vértice sobre la muestra, es decir, se ilumina mediante un acusado cono de luz, en lugar del haz más o menos paralelo que suministra normalmente el condensador. Esta iluminación se utiliza para algunos estudios específicos que se describirán en su momento.

3.4.3. Platina

En los microscopios de polarización la platina es giratoria y

dispone de una graduación con nonius para la medición de ángulos con una precisión que nominalmente alcanza la décima de grado.

3.4.4. Compensadores

Otra de las especificidades consiste en una ranura a 45° de las posiciones de polarización. Esta ranura está situada entre el objetivo y el analizador, y en ella es posible insertar una lámina anisótropa de retardo conocido con las posiciones de vibración a 45° de las de los polarizadores, denominada *compensador*, cuya utilidad se discutirá más adelante.

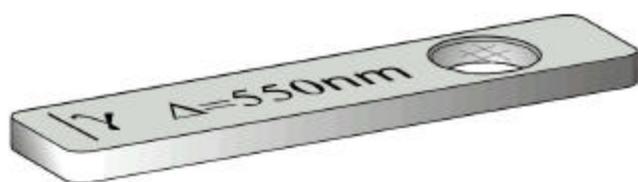


Figura 9. Aspecto de un compensador. La línea marcada indica la dirección de vibración de la onda rápida

El compensador más habitual en los trabajos de rutina es una lámina de cuarzo que produce un retardo de 550nm (rojo de primer orden), que en algunos modelos es ligeramente distinto, pero que en cualquier caso, está grabado en la montura. Además del retardo, en la montura del compensador está grabada una línea (normalmente perpendicular al alargamiento de la montura del condensador) y la letra griega γ , que indica la dirección de polarización de la onda de mayor índice de refracción. La utilización de este símbolo es una concesión histórica que recuerda que este tipo de compensadores se hacían antiguamente de yeso (de hecho en tratados antiguos se le ha denominado compensador de yeso, o yeso rojo) y en los cristales biáxicos como el yeso, el mayor índice de refracción se identifica con una γ .

Otro de los compensadores utilizados con frecuencia es una lámina de igual aspecto que la anterior, pero que produce un retardo de 110nm. Se la denomina compensador de *cuarto de onda*, y suele estar grabado de este modo ($\lambda/4$). El color de interferencia que

produce corresponde a uno de los grises de primer orden.

Para trabajos más específicos existen compensadores de cuarzo en forma de cuña, orientada como los anteriores, pero cuyo retardo es variable en función de lo que se introduzca la montura del mismo en la ranura. Normalmente llega a proporcionar tres órdenes de colores de interferencia, desde retardo cero hasta 1500nm. Se utiliza cuando se desea averiguar el retardo de una lámina anisótropa con mayor precisión que la que aportan los compensadores de retardo fijo.

Para mediciones precisas del retardo existen compensadores giratorios de retardo variable, que consisten en una lámina de cuarzo o calcita (según el rango que se desea medir) orientada con el eje óptico en la dirección del eje del microscopio. Dicha lámina puede oscilar sobre un eje a voluntad del operador, y se puede leer el ángulo de giro en un tambor lateral. El uso de este compensador de retardo variable permite mediciones precisas de diferencias de fase entre dos ondas que progresan por el tubo del microscopio y su empleo se discutirá ampliamente más adelante.



3.4.5. Lente de Bertrand

También en el tubo del microscopio, existe una lente abatible, denominada *lente de Amici-Bertrand* (a veces simplemente lente de Bertrand), que cuando está intercalada se incorpora al sistema óptico del objetivo modificando su distancia focal imagen hasta llevar a coincidir su plano focal con el plano focal objeto del ocular. En estas condiciones el microscopio actúa como un telescopio de Galileo (dos lentes con los focos imagen y objeto coincidentes), que enfoca permanentemente al infinito. Lo cierto es que con los objetivos del microscopio, el enfoque al infinito empieza poco más allá de unos milímetros de la lente frontal de objetivo. Por tanto, con la lente de Bertrand colocada, el microscopio no enfoca la muestra de la platina, sino que al observador le llega la luz que ha atravesado ésta, de forma que es posible poner de manifiesto algunos fenómenos de polarización e interferencia que se discuten en capítulos posteriores.

3.4.6. Oculares

Los oculares son convencionales, aunque su posición está fijada por una ranura en el tubo. Además, en el plano de formación de la imagen del objetivo, existe un retículo con dos líneas perpendiculares entre sí que indican las posiciones de vibración del polarizador y analizador en las condiciones normales de trabajo. Resulta anecdótico recordar que en los primitivos microscopios de polarización, dicho retículo se construía con dos hilos de tela de araña.

3.5. El microscopio de luz reflejada

El microscopio de polarización para trabajos con luz reflejada es, básicamente, un equipo similar al descrito para observaciones en luz transmitida, aunque necesariamente debe incorporar algunos cambios, especialmente en el sistema de iluminación. La geometría general de los microscopios de reflexión se puede ver en la Figura 10.

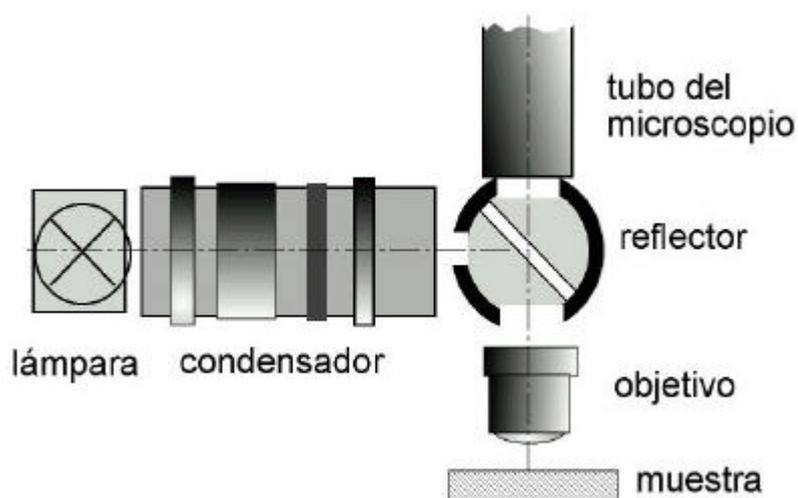


Figura 10. Disposición general del sistema de iluminación, reflector y objetivo en un sistema de microscopía de reflexión.

En estos equipos la muestra es opaca y no puede ser iluminada por transmisión. La luz debe llegar desde la parte superior de la preparación y reflejarse en ella. Esa es la luz que se utiliza para formar la imagen, por lo tanto, las particularidades del microscopio de reflexión son la lámpara y el condensador (incluyendo el polarizador incorporado), y el reflector de la luz que manda el haz procedente

del compensador hacia la muestra. El resto es, con muy pocas diferencias, idéntico a los equipos descritos anteriormente.

3.5.1. Lámpara de iluminación

En los microscopios de transmisión se pierde muy poca intensidad luminosa debido a absorción de la muestra o de las lentes, por lo tanto, es suficiente la intensidad luminosa suministrada por lámparas halógenas de bajo voltaje y potencia moderada (entre 15 y 30W). Pero en los equipos de reflexión se pierde buena parte de la intensidad de la lámpara en algunos reflectores, como se discutirá más adelante, y la muestra sólo refleja una parte de la luz que recibe. Ésto hace necesario el uso de lámparas halógenas de elevada potencia

(entre 50 y 100W). Estas lámparas desprenden mucho calor, por lo que el empleo de filtros anticalóricos resulta indispensable.

En trabajos con luz polarizada (sin analizador) una moderada potencia luminosa suele ser suficiente, pero en condiciones de polarizadores cruzados, suele ser necesario incrementar la emisión de la lámpara. Es por ésto que en los equipos de reflexión, la intensidad de la lámpara suele ser regulable para poder suministrar la totalidad del voltaje nominal la lámpara (o incluso sobrevoltar) y así aprovechar al máximo su emisión.

3.5.2. Condensador

La luz procedente de la lámpara es condensada por una serie de lentes y desviada en el reflector hacia el objetivo, antes de incidir sobre la muestra. Por lo tanto, en los microscopios de reflexión las lentes del objetivo forman parte del sistema de iluminación, lo que obliga a que el condensador sea distinto de los utilizados en microscopía de transmisión.

De modo genérico, el condensador es un sistema óptico de lentes que sitúan la imagen real de la lámpara en el plano focal imagen del objetivo, de tal manera que se genera un haz de luz que incide normalmente sobre la muestra. La imagen de la muestra así iluminada, se forma en el plano focal objeto del ocular, como en todos los microscopios. La presencia del reflector, que actúa en ambos sentidos, provoca, asimismo, la formación de otras imágenes reales del objeto sobre el eje del sistema de iluminación, aunque este aspecto carece de relevancia para los objetivos de este texto.

La disposición de las lentes del condensador de reflexión condiciona que los diafragmas de apertura y de campo ocupen

posiciones diferentes de las de los condensadores de transmisión. Así, el diafragma más cercano a la fuente de iluminación es el de apertura (DA), mientras que el que ocupa una posición intermedia en el sistema es el de campo (DC).

3.5.3. Polarizador

El condensador incorpora un polarizador, igual que en los equipos de transmisión. En este caso, la luz polarizada es desviada en el reflector (prisma o placa de vidrio), sobre el que incide bajo un cierto ángulo. Para evitar que, tras la reflexión, la composición de las correspondientes componentes transversal o longitudinal modifique el estado de polarización de la luz, el plano del polarizador debe ser perpendicular al plano de incidencia en el reflector. Normalmente, el plano de polarización debe estar de izquierda a derecha.

Hay que notar que si el plano de polarización fuese paralelo al de incidencia, tampoco se vería alterado el estado de polarización, pero en este caso habría una pérdida de intensidad, como se discutirá en el capítulo 6 (reflexión externa).

3.5.4. Reflector

El reflector es un sistema de desviación de la luz, necesario para hacer incidir sobre la muestra la luz proveniente del sistema de iluminación, que necesariamente ocupa una posición externa al propio eje del microscopio. Por lo tanto debe tratarse de una superficie reflectante que refleje la luz procedente de la lámpara, pero que a su vez permita el paso de la luz procedente de la muestra hacia el ocular.

Existen dos tipos de reflectores de campo claro, con propiedades ligeramente distintas, utilizados mayoritariamente en microscopía de reflexión. Por una parte los basados en una placa reflectante, y por otra los que están formados por un prisma.

Placa reflectante

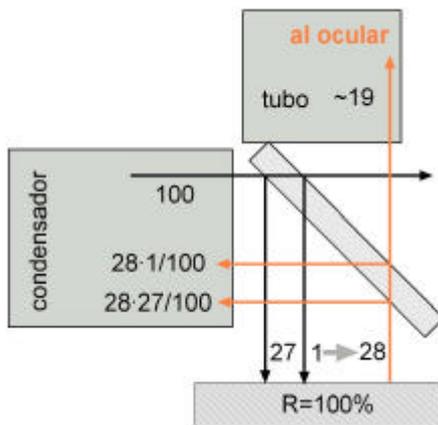


Figura 11. Cálculo aproximado del rendimiento luminoso de un reflector plano tratado para aumentar su eficacia. Sobre la muestra 100% reflectante llega un 28% de la luz emitida, que en parte de pierde en la segunda reflexión, de modo que al tubo del microscopio llega menos del 20%.

En esencia se trata de una placa de vidrio que refleja parte de la luz que incide sobre sus superficies, dejando pasar otra parte. Su rendimiento en términos de intensidad es bajo. Para mejorarlo se tratan las superficies del vidrio, de modo que se aumenta la reflexión de la primera cara, y se minimiza la de la segunda.

En un vidrio de índice de refracción 1.7 (para aumentar la reflectancia del mismo), el tratamiento mediante recubrimiento metálico de la primera cara llega a producir una reflexión del 27% de la luz incidente, mientras que se consiguen reflectancias inferiores al 1% en la segunda cara. La Figura 11 muestra las pérdidas de intensidad del haz procedente del sistema de iluminación, en el supuesto de una muestra completamente reflectante ($R=100\%$).

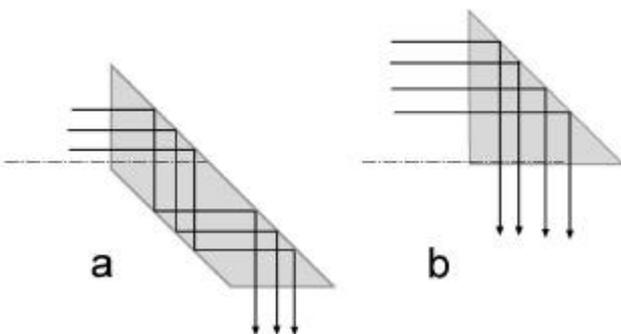


Figura 12. Prismas reflectores a) de Berek, b) simple. Nótese la diferente posición del eje del sistema de iluminación.

Prisma

La disposición de un prisma como reflector del sistema de iluminación, siendo un sistema que refleja el 100% de la luz que recibe, no puede ocupar la totalidad del campo del objetivo. En consecuencia, ocupa

la mitad del campo y la otra mitad se utiliza para la luz que asciende hacia el ocular. En estas condiciones, la iluminación es ligeramente oblícua, dependiendo de la apertura numérica del objetivo utilizado.

En microscopios de precisión, especialmente si se va a emplear para microscopía cuantitativa, el reflector es un prisma de Berek (Figura 12), en el cual la luz sufre una triple desviación. La razón es que, para un prisma de un vidrio de índice de refracción adecuado, con una incidencia cercana de 45° (superior al ángulo límite) como la que ocurre en la parte trasera del prisma, la diferencia de fase entre las componentes transversal y longitudinal de la luz polarizada, es de 60° (ver capítulo 6 para la correspondiente justificación teórica de este hecho). Si se producen tres reflexiones, la diferencia de fase total es de 180° , con lo que se elude cualquier posibilidad de polarización elíptica de la luz antes de incidir sobre la muestra, sea cual sea la posición del plano del polarizador.

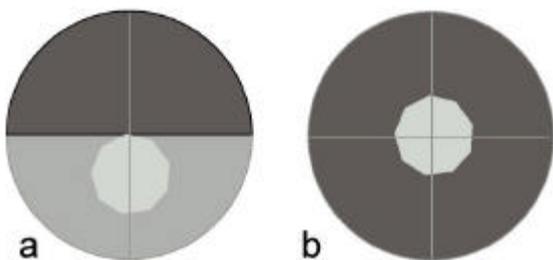
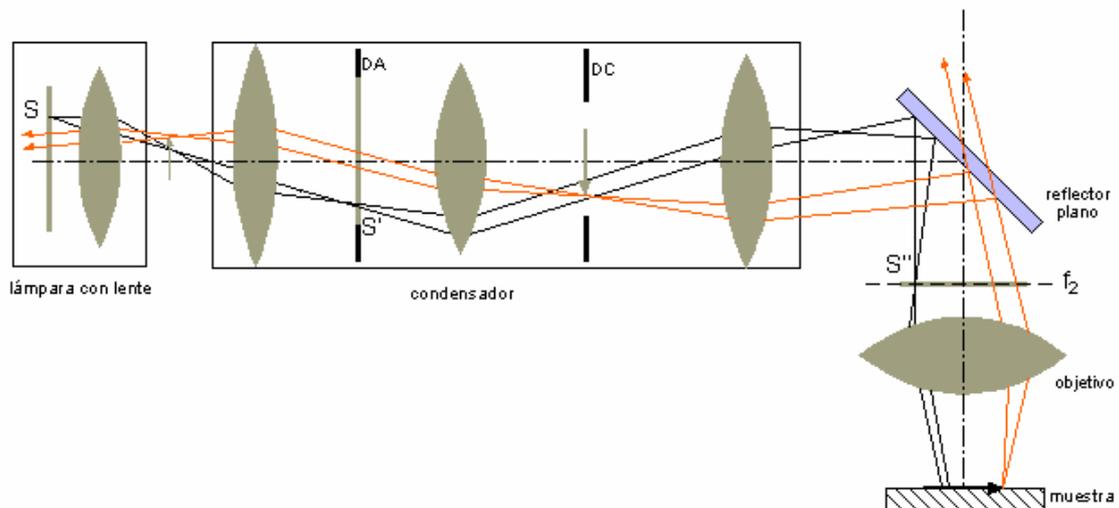


Figura 13. Centraje de la posición del diafragma de apertura para a) reflector de prisma; b) reflector plano

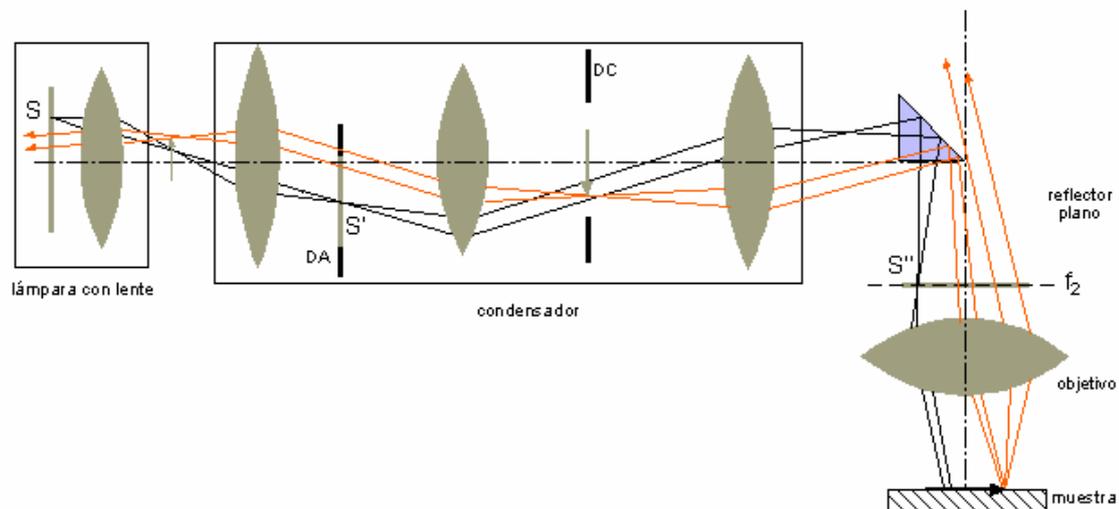
El centraje del microscopio cuando se usa un prisma de reflexión debe ser específico. Considerando que el prisma ocupa la mitad del campo del objetivo, debe desplazarse el diafragma de apertura para que no se pierda luz en las paredes del tubo. Por tanto, con la lente de Bertrand colocada para ver la imagen del DA, este debe moverse hasta que la imagen ocupe la

posición que muestra la Figura 13.

3.5.5. Objetivos . Los de baja apertura numérica son iguales, mientras que los de elevada apertura numérica suelen ser específicos para luz reflejada



Sistema de iluminación utilizando un reflector plano.



Sistema de iluminación con un reflector de prisma

Figura 14. Esquemas de los sistemas de iluminación utilizando ambos tipos de reflectores. En ambos casos, la imagen del difusor de la lámpara S , se forma en el plano del diafragma de apertura y en el plano focal f_2 del objetivo. Por su parte, los rayos que se reflejan en el objeto (dibujados en naranja) forman una imagen real del mismo en el tubo, más otras imágenes en el plano del diafragma de campo y en el plano focal de una de las lentes del condensador. Nótese la posición del diafragma de apertura y del prisma respecto del eje del condensador.

3.6. Centraje y puesta a punto del microscopio

Ésta es una operación rutinaria que debe efectuarse a menudo, puesto que el uso, el intercambio de objetivos, la intercalación periódica de lentes y accesorios, las vibraciones del puesto de trabajo, etc. acaban descentrando los componentes del microscopio respecto de su posición ideal sobre el eje óptico del equipo. Por ello resulta conveniente que antes de cada sesión de trabajo se compruebe, y en su caso se corrija, la posición de todas y cada una de las partes del microscopio. A continuación se describen, de modo práctico, las operaciones normales de centraje del equipo, aunque éstas pueden variar ligeramente de un fabricante a otro por las especificidades de cada equipo.

El inicio de la operación con el microscopio precisa que todos sus componentes estén en correcto funcionamiento y convenientemente alineados a lo largo del eje del microscopio, desde la lámpara de iluminación hasta el ocular de observación. La movilidad de cada uno de los componentes varía entre fabricantes y modelos, de modo que en modelos más sofisticados y versátiles, es posible el centraje de la mayoría de sus componentes.

- Lámpara: si el microscopio lo permite, hay que empezar por el centraje de la lámpara, lo cual implica disponer el filamento de la misma (normalmente cuadrado o rectangular) lo más centrado posible sobre el eje del sistema. El proceso mecánico es diverso según el fabricante, aunque la “observación” del filamento a través del tubo suele llevarse a cabo mediante la colocación de la lente de Bertrand, entre otros posibles accesorios. En cualquier caso hay que centrar el filamento retirando los difusores de que normalmente disponen los portalámparas de microscopía.

- Condensador: en muchos modelos el condensador dispone de una cremallera que permite su desplazamiento vertical. Como la imagen del diafragma de apertura se forma en el plano focal del objetivo, colocando la lente de Bertran, debe desplazarse el condensador hasta que la imagen se vea enfocada. Normalmente para objetivos de pocos aumentos el condensador está en la parte más baja de su recorrido, mientras que para los de gran aumento debe estar en la parte superior.

En los microscopios en que sea posible centrar el condensador, esta operación debe hacerse cerrando el diafragma de campo y centrando su imagen mediante los tornillos del condensador. El objetivo debe estar centrado, de otro modo el centraje del condensador sería erróneo porque su imagen estaría desplazada del eje del microscopio por la lente frontal del objetivo descentrado.

- Diafragma de campo: para tareas convencionales que requieran la observación de todo el campo, el diafragma de campo debe estar abierto de modo que su imagen quede ligeramente fuera del campo de visión, lo cual se consigue cerrando el mismo y abriéndolo lo necesario.

- Diafragma de apertura: su imagen se observa mediante la intercalación de la lente de Bertrand. Debe estar abierto unos $2/3$ del campo total para un correcto contraste de la imagen

- Platina y objetivos: teniendo en cuenta que la platina es giratoria, debe garantizarse que su eje de giro sea coincidente con el eje óptico del microscopio. Hay dos procedimientos posibles para conseguirlo, que varían de un fabricante a otro. En general se puede admitir que el microscopio propiamente dicho (platina-objetivo-ocular) consta de tres ejes independientes que deben alinearse. Fijados

dos de ellos, hay que desplazar el tercero hasta que esté en línea con los otros dos. En todos los modelos el ocular es fijo, por lo tanto, o se centra el eje de giro de la platina, o se centra el eje óptico del ocular. Unos modelos adoptan un sistema , otros el otro.

Cuando se centra la platina existen dos tornillos a 90° bloqueables, que trabajan contra sendos muelles, que permiten desplazar el centro de giro de la platina. Una vez centrada se fija con un tornillo final de carrera o cualquier otro sistema mecánico de bloqueo. Si se centran los objetivos, suele hacerse a través del desplazamiento de su lente frontal, que está sobre dos anillos excéntricos, montados uno sobre el otro. En este caso hay que mover uno de los anillos sujetando el otro, y así hasta conseguir el centraje. Esta operación hay que efectuarla para cada objetivo.

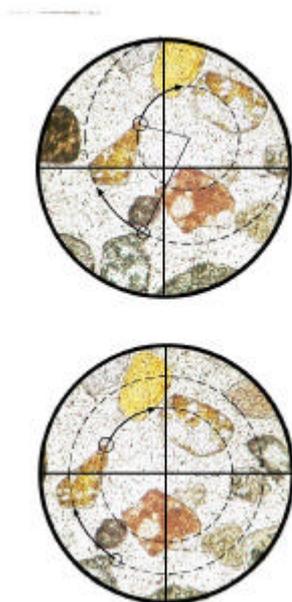


Figura 16. En la imagen superior, dos puntos cualesquiera describen círculos cuyo centro no coincide con el centro del campo de visión. En centraje consiste en llevar el centro de giro al punto de cruce del retículo.

El control del centraje se realiza observando un punto de la preparación y girando la platina. Si el microscopio está centrado (los tres ejes en línea), el punto observado debe describir un círculo concéntrico al punto de cruce de los hilos del retículo. Si no lo está, describe un círculo cuyo centro imaginario no está en el centro de la imagen (Figura 16).

El centraje consiste en llevar este centro de giro al punto de cruce del retículo lo que normalmente no se consigue totalmente en una única operación, y hay que repetir el centraje un par o tres de sucesivas aproximaciones hasta alcanzar el nivel de precisión deseado.

- Polarizadores. Para las observaciones normales, los dos

polarizadores deben estar perfectamente cruzados. Para comprobar ésto, sin preparación alguna en la platina, con un objetivo de apertura numérica pequeña (normalmente uno de pocos aumentos), cruzando ambos polarizadores, el campo debe verse completamente oscuro. Si no ocurre así, es posible que el analizador esté ligeramente girado (algunos modelos lo permiten), o que la disposición mecánica del polarizador o del analizador no sea la correcta.

3.7. Estereomicroscopio

Los estereomicroscopios permiten una visión tridimensional partiendo de la base que cada ojo observa una imagen distinta. Así pues, el estereomicroscopio dispone de dos objetivos y dos oculares, es decir, prácticamente de dos microscopios que observan la muestra desde ángulos ligeramente distintos, lo cual da la visión estereoscópica. Debido a que estos microscopios requieren distancias de trabajo grandes, sus aumentos son relativamente limitados, no superando el centenar en los casos extremos.



Figure 17 Imagen de un estereomicroscopio.

Su uso se limita a la observación de muestras a pocos aumentos, sin preparación previa de las mismas, habitualmente con iluminación episcópica, aunque existen modelos con iluminación de campo oscuro y/o por transparencia en campo claro. Muchos de los modelos incorporan un cambio de aumentos mediante un mecanismo zoom, y algunos, diafragma de apertura en el tubo para aumentar la profundidad de campo en algunas observaciones.

3.8. Observaciones especiales

La microscopía permite un amplio abanico de observaciones

para aplicaciones específicas, de las cuales se aplican específicamente al estudio de materiales cristalinos. No obstante, son posibles otras aplicaciones que ponen de manifiesto características específicas de las muestras. En ocasiones, éstas deben estar específicamente preparadas para un tipo particular de observación.

De las posibles aplicaciones especiales de la microscopía, se han escogido tres que parecen de particular interés, aunque su utilidad no se circunscribe exclusivamente al estudio de los materiales cristalinos.

3.8.1. Observaciones en campo oscuro

Básicamente consiste en la observación de la muestra evitando la luz directamente transmitida o reflejada por ésta, según la observación se efectue por transmisión o reflexión, respectivamente. Recibe el nombre de las observaciones por transmisión, en las que la imagen se observa sobre un fondo negro. Este tipo de iluminación permite observar características internas de la muestra, evitando la luz directamente transmitida o reflejada, cuya intensidad impediría ver los aspectos internos, de mucha menor intensidad.

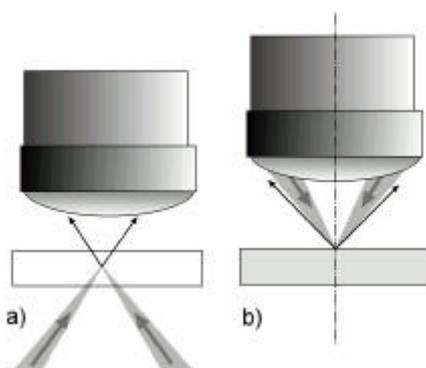


Figura 18

Tanto por transmisión como por reflexión se ilumina la muestra mediante un cono hueco de luz, en cuyo interior no hay luz, con lo cual la muestra es iluminada oblicuamente (Figura 18 a - transmisión -y b -reflexión -). Se requieren condensadores específicamente diseñados para esta iluminación, así como objetivos especiales para reflexión, puesto que en este tipo de observaciones éstos forman parte de sistema de iluminación.

En el caso de las observaciones por transmisión, la iluminación hace posible la observación de características internas, porque al evitar el haz directamente transmitido, es posible poner de manifiesto pequeñas inclusiones o discontinuidades que de otro modo quedarían “tapadas” por la intensidad transmitida directamente.

La aplicación de la iluminación de campo oscuro en microscopía de reflexión sólo tiene sentido en la observación de muestras relativamente poco absorbentes, puesto que en medios altamente absorbentes, la luz es completamente reflejada en la superficie, no penetra en el interior y, por tanto, no hay nada que observar.

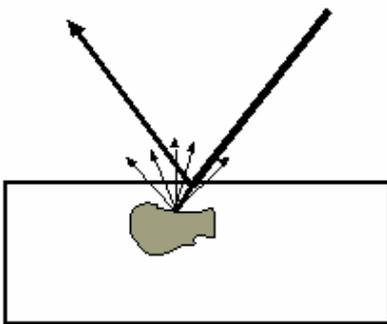


Figura 19

Por el contrario, si la muestra es relativamente transparente, parte de la luz penetra en su interior y sufre reflexiones internas, que son recogidas por el objetivo (Figura 19). Dichas reflexiones también se producen en observaciones convencionales en campo claro, pero normalmente son de tan poca intensidad que la intensidad del haz normalmente reflejado no permite verlas.

Figura 20 Foto campo oscuro

3.8.2. Contraste de fases

Se trata de un procedimiento cualitativo para realzar pequeñas diferencias de índice de refracción, de tal manera que una muestra que contenga zonas de igual color o transparentes, en las que sólo sus índices de refracción difieren ligeramente, pueden ser contrastadas de modo suficiente para ser discriminadas. Esta es una situación característica de preparaciones biológicas, no obstante la técnica también puede ser aplicada en casos especiales a materiales

inorgánicos.

Cuando una onda atraviesa un medio de índice de refracción superior a uno, avanza más lentamente que en el vacío, lo que ocasiona cierto retardo respecto de una onda que no ha atravesado ese medio. Lo que ocurre es una diferencia de fase, pero no de amplitud y esta diferencia no es detectable sin un sistema óptico la transforme en diferencia de amplitud, ya que el ojo discrimina las imágenes por sus distintas amplitudes (intensidades) que llegan a la retina. Esta es la función del sistema de contraste de fases.

El contraste de fases es un procedimiento adecuado para retardos entre $\lambda/10$ a $\lambda/2$. Por encima de este valor se producen halos que enmascaran la imagen. El sistema apropiado para retardos iguales o superiores a $\lambda/2$ es el contraste interferencial de Nomarsky, que se discutirá seguidamente.

El sistema de contraste de fases se basa en el hecho de que cuando un haz de luz atraviesa la muestra se producen conos de haces difractados con un retardo respecto del haz directo de $\lambda/4$, independientemente del retardo que éste haya acumulado al atravesar la muestra. De alguna manera, el haz directo puede considerarse el difractado de orden cero, y los correspondientes conos, de orden uno, dos, etc. La diferencia de intensidad entre el haz directo y los difractados es muy grande y éstos, al recombinarse, no producen sensación apreciable alguna.

Si se logra aumentar el retardo de $\lambda/4$ a $\lambda/2$, al combinarse se producirá una interferencia destructiva, que implica un cambio en la amplitud, y por tanto detectable por el ojo. Además, hay que reducir la intensidad del haz directo para que el efecto sea apreciable.

Estos efectos se logran mediante el uso de un diafragma anular en el condensador: un disco opaco que deja pasar un anillo de luz (Figura 21). Este diafragma está colocado de tal modo que el objetivo forma una imagen del mismo en su plano focal imagen. El propósito de este anillo es separar el haz directo de los refractados al introducir cierta inclinación en la iluminación.

Por su parte, para aumentar el retardo a $\lambda/2$ hay que incorporar en el objetivo una lámina que produzca un retardo de $\lambda/4$ de los haces difractados respecto del directo. Esta lámina tiene un anillo absorbente (normalmente una deposición metálica) que coincide con la imagen del anillo transparente del diafragma del condensador (ver Figura 21). De este modo la intensidad del haz directo se reduce hasta en un 80%. El resto tiene un film transparente que produce el retardo adecuado respecto del directo, que no es retardado.

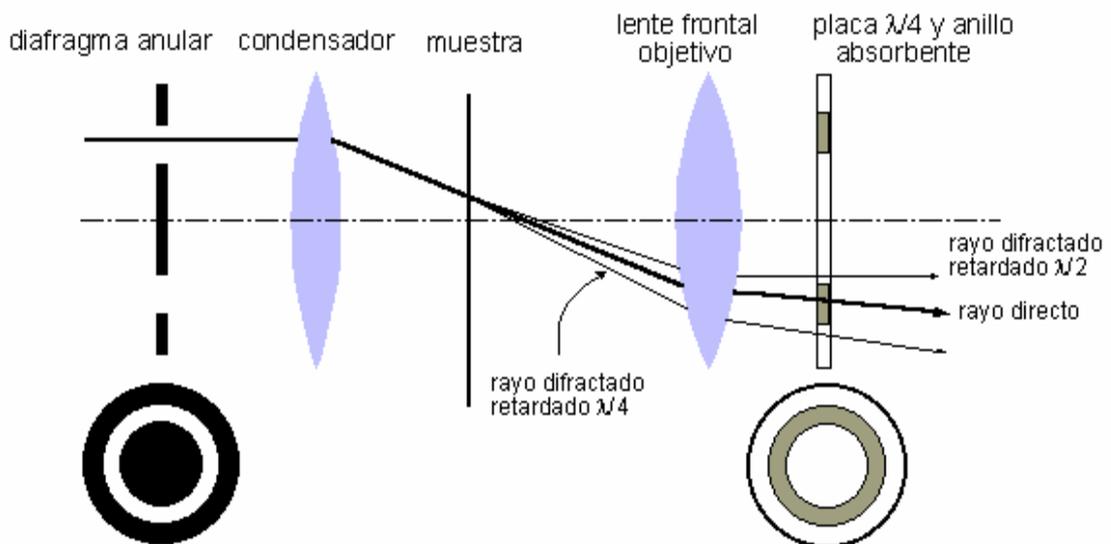


Figura 21

En estas condiciones, al combinarse de nuevo los haces, se produce una interferencia casi destructiva puesto que el retardo es cercano a $\lambda/2$. Las diferencias entre unos haces y otros procedentes de la muestra situada en la platina, dependen del retardo ocasionado por

las diferencias de índices de refracción de las fases atravesadas. Se dispone, por tanto, de un sistema que pone de manifiesto las pequeñas diferencias de índice de refracción, es decir, de un contraste de fases.

Nótese que si el anillo absorbente del objetivo fuera completamente opaco se tendría un sistema muy cercano al campo oscuro. La reducción de la intensidad del haz directo es necesaria para equilibrar las intensidades de éste y los difractados, en caso contrario el efecto no sería detectable.

El sistema utiliza objetivos especiales, similares a los normales pero que incorporan la lámina anular. En muchos modelos, cada objetivo requiere un diafragma específico, de modo que, frecuentemente, éstos están montados en un revólver que permite intercalar el adecuado para cada objetivo.

El centraje del sistema requiere que las imágenes del diafragma y del anillo del objetivo coincidan. Para ello se intercala el diafragma, y como la imagen de éste se forma en el plano focal objeto del objetivo, es posible observarla intercalando la lente de Bertrand. En estas condiciones se observan las imágenes del diafragma anular del condensador y del anillo del objetivo, que hay que hacer coincidir.

3.8.3. Contraste interferencial (Nomarsky)

El sistema de contraste interferencial desarrollado por Nomarsky a mediados de los años 50 es una herramienta complementaria del contraste de fases descrito en la sección anterior. Su rango de trabajo son diferencias de camino entre $\lambda/4$ y λ . Se trata de un instrumento cualitativo, puesto que no permite mediciones de retardos y simplemente genera una imagen de color (debido a

interferencias) con claros y oscuros, que simula un relieve que en realidad no existe. Los claros y oscuros que generan este falso relieve se deben a fenómenos de interferencia, y las imágenes deben ser interpretadas en este sentido.

El equipo se basa en un mecanismo de desdoblamiento del haz que incide en la muestra, para ser recombinado antes de la formación de la imagen por el ocular. Tratándose de un sistema interferencial, requiere el uso de luz polarizada, y por tanto se deben intercalar el polarizador y el analizador.

En el condensador se intercala un prisma de Wollaston modificado que desdobla la luz polarizada en dos ondas vibrando en planos perpendiculares entre sí. A la salida del condensador, estas ondas se propagan paralelamente, y así atraviesan o inciden en la preparación (según sea luz transmitida o reflejada). Como viajan en paralelo, se juntan en el plano focal imagen del objetivo, y un segundo prisma las recombina en un único camino óptico. Así llegan al analizador, que al llevarlas a vibrar en un solo plano de polarización, interfieren (Figura 22).

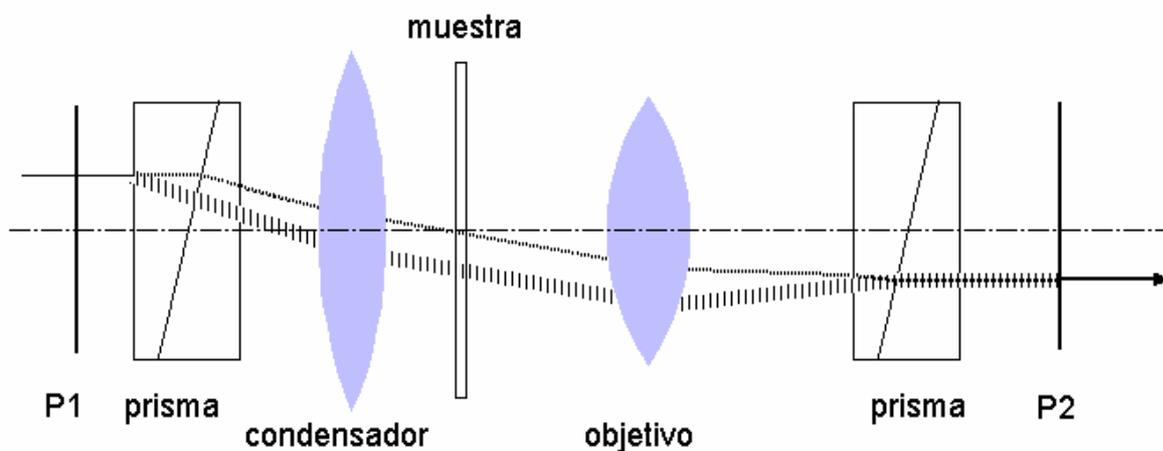


Figura 22

La diferencia de camino entre las dos ondas que da lugar a uno u otro color de interferencia se produce al atravesar la preparación (en luz transmitida), o al reflejarse en planos distintos en la muestra (en luz reflejada). Por lo tanto, los colores que contrastan la imagen generada reflejarán discontinuidades ópticas (diferencias de índice de refracción), o diferencias de plano de reflexión (en luz reflejada) entre las dos ondas desdobladas. Hay que señalar que los dos haces avanzan en paralelo separados una distancia muy pequeña (para una mejor comprensión del esquema de la Figura 22 se ha exagerado la distancia entre haces), que es precisamente la que controla el límite de resolución del sistema.

El equipo consta de un prisma que se incorpora al condensador, y de anillos que soportan objetivos convencionales, los cuales a su vez, incorporan el segundo prisma. Los prismas del condensador suelen estar diseñados para objetivos específicos, de modo que hay que cambiarlos para cada objetivo. El segundo prisma suele ser el mismo para todo el rango de aumentos.

En los dispositivos para luz reflejada, un único prisma incorporado en el objetivo es suficiente, puesto que actúa como desdoblador del haz y como recombinador del mismo una vez reflejado en la muestra.

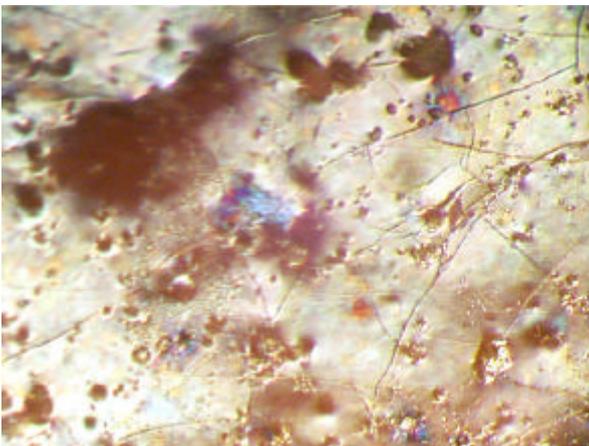


Figura 23. Imagen de una superficie obtenida por reflexión, mediante contraste interferencial de Normarsky.

3.8.4. Microscopía de fluorescencia UV

Un microscopio de fluorescencia permite observar la emisión fluorescente de la muestra situada en la platina, cuando es excitada mediante radiación ultravioleta. Se trata de un microscopio

convencional con un sistema de iluminación UV y la inclusión de algunos filtros. No tratándose de un microscopio UV (la luz que se observa es visible), no requiere el uso de óptica especialmente transparente a la radiación UV, y es posible observar la emisión de fluorescencia mediante microscopía de transmisión o de reflexión, indistintamente. Se trabaja sin polarizadores, en parte porque éstos reducen la intensidad emitida, y en parte porque serían dañados por el calor emitido por las lámparas UV.

Los filtros requeridos son los de *excitación* y los filtros *barrera*. Los primeros, colocados en el condensador, tienen la función de filtrar la parte de radiación UV que se desea para la excitación, a la vez que eliminan el exceso de radiación roja que suelen emitir las lámparas de ultravioleta. Los filtros *barrera* (o de parada), colocados en cualquier parte de tubo por encima del objetivo, eliminan el exceso de radiación UV que ha atravesado la muestra. De otro modo ésta dañaría la retina del observador (Figura 24).

Las lámparas de iluminación suelen ser de vapor de Hg o de xenon. Ambos tipos son de chispa, y la descarga eléctrica excita mercurio vaporizado o xenon a baja presión, que emiten un amplio espectro de radiación, una parte de la cual corresponde a la zona del ultravioleta próximo (hasta 200nm). La misión de los filtros de excitación es cortar la parte del espectro emitido que no interesa para la observación. Por otra parte, ambas lámparas emiten calor, por lo que resulta indispensable el uso de filtros anticalóricos inmediatamente después de la lámpara, para evitar que se dañen los sistemas ópticos del microscopio.

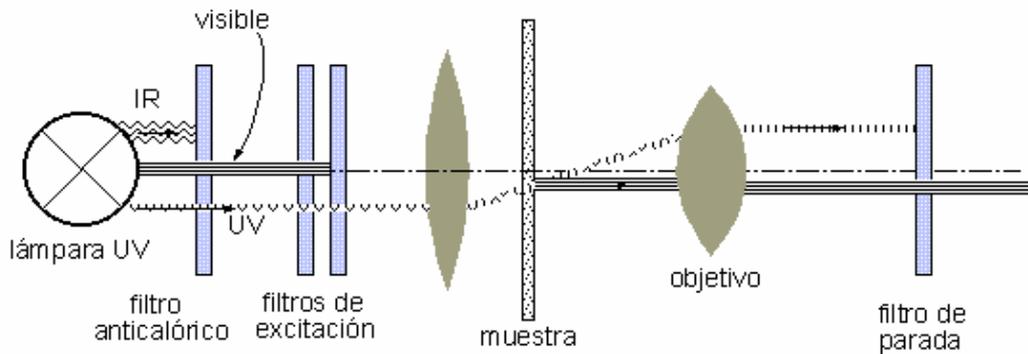


Figura 24. Esquema de la disposición de los componentes en un microscopio de fluorescencia UV. El filtro anticalórico corta la radiación IR, y deja pasar la visible (que es cortada por los filtros de excitación) y la UV (que es selectivamente transmitida por los filtros de excitación). La radiación UV excita la fluorescencia de la muestra y, en parte, la atraviesa. El filtro de parada corta la radiación UV transmitida (para que no llegue al ojo) y trasmite la emisión fluorescente visible emitida por la muestra.

3.9 Preparaciones microscópicas para transmisión

En el microscopio de transmisión la luz atraviesa la muestra, de modo que ésta debe ser suficientemente delgada como para que la luz la atraviese con intensidad suficiente como para realizar una buena observación. Por lo tanto, las preparaciones de cristales de cualquier

naturaleza o de rocas deberán tener un espesor cercano a las $30\mu\text{m}$ para que se pueda formar una imagen nítidamente observable.

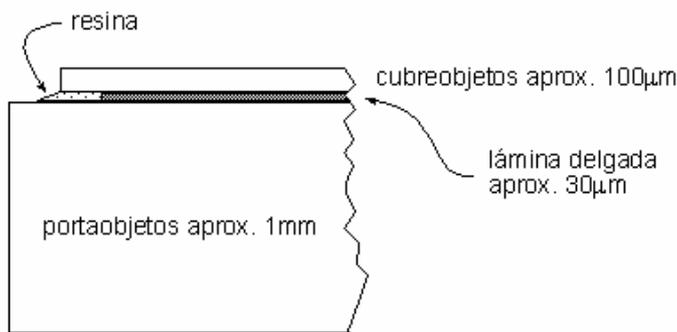


Figura 25. Sección de una preparación microscópica para transmisión. Se han conservado las proporciones entre los diversos componentes, cuyo espesor aproximado de cita.

Las preparaciones microscópicas de materiales inorgánicos constan de un soporte de vidrio, que se denomina *portaobjetos*, de dimensiones variables (2.5 o 3cm x 5 o 6cm) y de un espesor ligeramente inferior al milímetro. Al

portaobjetos se adhiere el fragmento de material a preparar del que se ha desbastado una superficie plana de corte, con una resina sintética

(acrílica, vinílica o epoxídica) de índice de refracción 1.5, prácticamente idéntico al del vidrio, de modo que forma con éste un contacto óptico sin reflexiones internas. Antiguamente se adhería con una resina natural llamada bálsamo del Canadá, denominación que aún persiste en algunos tratados.

El fragmento adherido al vidrio se corta paralelamente al soporte, y se desbasta y pule hasta que alcance las $30\mu\text{m}$. El proceso de pulido es delicado porque se pretende alcanzar espesores muy finos y la lámina que se requiere ha de tener las caras paralelas evitando que forme una cuña.

En la mayoría de los casos y en las observaciones rutinarias, una vez alcanzado el espesor requerido, la preparación se recubre con un vidrio de espesor cercano a las $100\mu\text{m}$, adherido con la misma resina y por idénticas razones de evitar reflexiones internas en las interfases vidrio-resina. El vidrio que cubre la preparación se denomina *cubreobjetos*. Su espesor viene limitado por la distancia libre de trabajo de los objetivos de gran apertura numérica, que suele ser de $170\mu\text{m}$, y que tienen que enfocar todo el espesor de la preparación a través del cubreobjetos.

En algunos casos se evita cubrir la preparación para disponer de la misma para otro tipo de análisis, además del microscópico de polarización. En estos casos la observación debe hacerse colocando una gota de aceite de inmersión y un cubreobjetos para evitar de este modo la dispersión de la luz que tendría lugar en las rugosidades de la superficie superior de la preparación.