

1. Título práctica de laboratorio:

MICROSCOPIA

Integrantes:

Código:

2. OBJETIVOS

General

Desarrollar las habilidades básicas en el conocimiento y manejo del microscopio con el fin de analizar adecuadamente micropreparados estableciendo medidas reales de las estructuras observadas.

Específicos:

- Identificar y explicar las funciones de las partes de un microscopio compuesto
- Aprender a realizar montajes húmedos y determinar la magnificación de lo observado.
- Determinar el diámetro del campo de visión en los diferentes objetivos utilizados, y calcular tamaños reales de las diferentes estructuras observadas

3. REFERENTES CONCEPTUALES

Palabras clave: Partes del microscopio, Montaje húmedo, Unidades de medida, Diámetro campo de visión.

La invención de dos aparatos de óptica, el telescopio y el microscopio compuesto, a finales del siglo XVI y principios del XVII, ha contribuido a modificar la concepción que el hombre tenía del mundo. Con el primero se empezó a sondear la profundidad del cosmos y con el segundo el mundo de lo infinitamente pequeño (1). Hacia los años 1590 y 1610, se reconoció como el primer constructor del microscopio compuesto a Zaccharias Janssen de Middleburg (Holanda). Posteriormente, Antoine Van Leewenhoek también holandés, reveló el mundo de los organismos microscópicos al observar los animalículos conocidos hoy como protozoarios y bacterias, presentes en gotas de agua, que observó en un microscopio simple o lupa, constituido por una lente esférica. Los microscopios actuales se parecen muy poco a los primeros aparatos y paralelo a su desarrollo y perfeccionamiento, se han logrado importantes descubrimientos (1). Existen diversos microscopios y tipos de iluminación; entre los principales se encuentran: el microscopio común de luz transmitida o combinado con iluminación por transmisión y reflexión, con campo oscuro, con contraste de fase: el microscopio invertido, el microscopio con luz polarizada y el microscopio con

luz ultravioleta. Los anteriores trabajan con luz fotónica, mientras el microscopio electrónico tiene como fuente de luz haces de electrones y en vez de lentes utiliza campos electromagnéticos (1).

Es así como los biólogos frecuentemente utilizan el microscopio de luz para observar especímenes con tamaños muy pequeños. Un microscopio de luz es un sistema coordinado de lentes arreglados para producir una imagen bien clara y definida del espécimen con un mayor tamaño. La invención del microscopio de luz fue muy importante para la biología, debido a que éste fue usado para formular la teoría celular y el estudio de la estructura biológica a nivel celular. El microscopio de luz reveló un infinito mundo al ojo y la mente humana. Hoy es un instrumento fundamental para la mayoría de los científicos que requieren de él (1).

Partes del microscopio

El microscopio compuesto (figura 1) está conformado por:

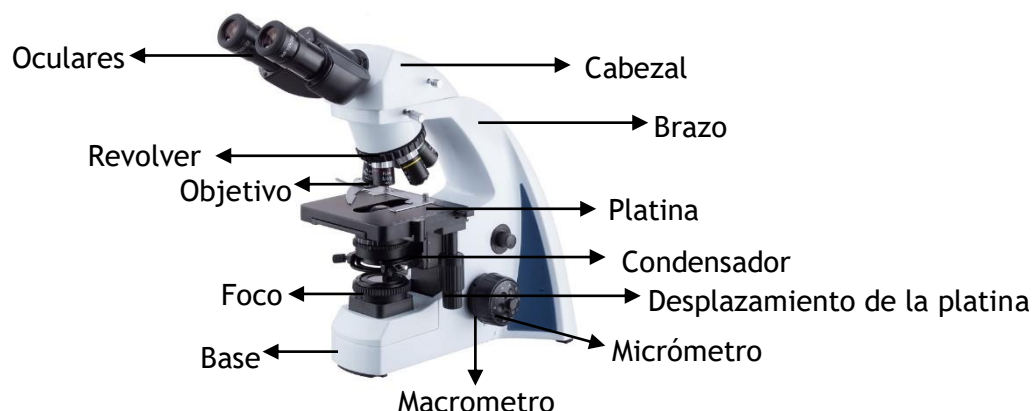


Figura 1: Partes del microscopio. Fuente: <https://quimicompany.com.co/product/microscopio-binocular-serie-ic2100/>

Parte mecánica:

- **Pie o soporte:** Sirve como base al microscopio y en él se encuentra la fuente de iluminación.
- **Platina:** Superficie sobre la que se colocan las preparaciones. En el centro se encuentra un orificio que permite el paso de la luz. Sobre la platina hay un sistema de pinza o similar, para sujetar el portaobjetos con la preparación, y unas escalas que ayudan a conocer qué parte de la muestra se está observando. La platina presenta 2 tornillos, generalmente situados en la parte inferior de la misma, que permiten desplazar la preparación sobre la platina, en sentido longitudinal y transversal respectivamente.
- **Tubo:** cilindro hueco que forma el cuerpo del microscopio. Constituye el soporte de oculares y objetivos.
- **Revólver portaobjetivos:** estructura giratoria que contiene los objetivos.
- **Brazo:** une el tubo a la platina. Lugar por el que se debe tomar el microscopio para trasladarlo de lugar.
- **Tornillo macrométrico (enfoco grueso):** sirve para obtener un primer enfoque de la muestra al utilizarse el objetivo de menor aumento. Desplaza la platina verticalmente de forma perceptible a simple vista.

- **Tornillo micrométrico** (enfoque fino): sirve para un enfoque preciso de la muestra, una vez que se ha realizado el enfoque con el macrométrico. También desplaza verticalmente la platina, pero de forma prácticamente imperceptible.

En la mayoría de microscopios de luz, estos dos tornillos se encuentran en un mismo eje, en donde el mecanismo de funcionamiento es por piñones muy finos llamado de cremallera, el cual no puede ser forzado so pena de ser estropeado.

Parte Óptica:

- **Oculares:** son los sistemas de lentes más cercanos al ojo del observador, situados en la parte superior del microscopio. Son cilindros huecos provistos de lentes convergentes cuyo aumento se reseña en la parte superior de los mismos (generalmente 10X).
- **Objetivos:** son sistemas de lentes convergentes que se acoplan en la parte inferior del tubo, mediante el revólver. Un anillo coloreado es distintivo de los aumentos de cada objetivo, que también van reseñados en el lateral del mismo. Los objetivos corrientes utilizados son: 4X y 10X o de menor aumento, 40X o de mayor aumento y 100X o de inmersión, esto porque el objetivo no enfoca bien la preparación al aire, y se debe utilizar un aceite especial, llamado de inmersión.
- **Condensador:** sistema de lentes convergentes que capta los rayos de luz y los concentra sobre la preparación, de manera que proporciona mayor o menor contraste.
- **Diafragma:** mecanismo que al abrirlo o al cerrarlo permite graduar la intensidad de la luz. Bajo el diafragma se encuentra ocasionalmente un Anillo Portafiltro. Tanto el condensador como el diafragma se encuentran conformando una unidad bajo la platina.
- **Fuente de iluminación:** el aparato de iluminación está constituido por una lámpara halógena de bajo voltaje (12V) situada en el pie del microscopio. La luz procedente de la bombilla pasa por un reflector que envía los rayos luminosos hacia la platina, los rayos luminosos atraviesan así el condensador y la preparación para finalmente pasar por el objetivo y el ocular, que están dispuestos en el mismo eje óptico.
- **Distancia de Trabajo o Distancia Focal:** es el espacio que existe entre la superficie de la lente del objetivo y la laminilla, una vez se encuentre enfocada la preparación. A mayor aumento del objetivo disminuye la distancia de trabajo, y para los objetivos de mayor aumento y de inmersión es menor de 1mm; o sea, estos objetivos se colocan muy cerca de la preparación, pero no deben tocarla directamente, ya que se puede romper la laminilla, o rayar los objetivos o causar daño mecánico al microscopio (2).

Principios ópticos

Una lente sencilla (biconvexa) posee dos focos, uno a cada lado de la lente, cuando los rayos luminosos pasan a través de la lente, se concentran en el foco. Si el objeto se coloca a una distancia mayor del foco, se obtiene una imagen real; mientras que, si el objeto se localiza a una distancia menor del foco, la imagen será virtual. Se podría pensar que al emplear lentes adicionales se lograrían mayores aumentos, pero en la formación de la imagen, no solo es importante la ampliación, se requiere que la imagen sea nítida, para lo cual es necesario combinar los diferentes poderes del microscopio, los cuales son:

- **Poder de aumento:** Permite magnificar la imagen. En general el número de aumentos está dado por la relación: $A = \# \text{ ocular} \times \# \text{ objetivo}$
- **Poder de resolución:** Capacidad de distinguir claramente los pequeños detalles presentes en un objeto. Para la mayoría de las personas, los objetos que están separados entre sí por una distancia menor de 0.1 mm, no pueden ser vistos como objetos separados a simple vista. El

microscopio permite visualizar de forma separada objetos que están mucho más unidos, aún objetos que de otra forma parecen constituir una unidad.

- **Poder de definición:** Permite formar imágenes claras, nítidas con contornos definidos.
- **Poder de profundidad de foco (penetración):** Permite observar varios planos con un mismo enfoque.

Verificaciones Preliminares

- Al iniciar la práctica llene la hoja de inventario con los datos correspondientes al microscopio asignado.
- Si va a mover el microscopio tómelo con una mano del brazo, y con la otra mano sosténgalo por la base. Utilice siempre las dos manos al transportar el microscopio. Colóquelo cuidadosamente sobre la mesa de laboratorio de tal manera que los oculares queden mirando hacia usted.
- Revisar que todas las partes se encuentren limpias y en buen estado. Si presentan daño alguno avise inmediatamente a la persona encargada o al docente.
- Gire el revólver hasta que el objetivo de menor aumento 4X quede alineado con el ocular (se siente un golpecito al quedar en posición de uso). Abra luego el diafragma completamente y gradué el condensador de tal manera que quedé cerca de la platina. Mire por el ocular y haga los ajustes finales hasta que el CAMPO DE VISION quede uniformemente iluminado (a manera de una luna llena).
- Si las lentes de los oculares u objetivos están sucias u opacas, límpielas con el papel de arroz impregnado de alcohol isopropílico, moviéndolo circular y suavemente. NUNCA use tela u otro tipo de papel, RAYARÁ los lentes.
- Realice todas las observaciones propuestas e indique en cada una de sus figuras o dibujos: nombre del objeto observado y sus detalles o contenidos, tipo de montaje, aumento, tamaños, etc.
- Una vez terminada la práctica gire el revólver de tal forma que el objetivo de menor aumento (4X) quede alineado con el ocular en forma vertical y a una distancia de 4 o 5 cm de la platina. Esto se llama POSICIÓN DE TRABAJO.

Preparación de un Montaje Húmedo

- Sobre una lámina portaobjetos limpia, coloque una gota de agua
- Dentro de la gota de agua coloque el objeto que va a observar
- Acerque la laminilla cubre objetos en posición oblicua y apoyando una arista sobre el portaobjetos al lado de la gota, déjela caer suavemente sobre esta, evitando la formación de burbujas de aire.
- La preparación debe quedar totalmente cubierta y embebida en el líquido. Evite el exceso de agua (o colorantes en preparaciones coloreadas) en los bordes de la laminilla o sobre esta, retire el exceso con papel absorbente.
- Antes de colocar la lámina sobre la platina, fíjese que esté completamente seca en la parte inferior. Si Usted ve que la preparación se está deshidratando puede agregar agua por goteo al lado de la laminilla (3). Manejo del Microscopio Para el uso correcto del microscopio es importante y necesario seguir los pasos que se describen a continuación:
- Iluminación: prenda el microscopio con el objetivo de menor aumento (4X), observe por el ocular y ajuste la luz hasta lograr una iluminación uniforme en el campo de visión (a manera de una luna llena). El condensador debe estar cerca de la platina y el diafragma abierto.
- Enfoque visual a menor aumento, coloque la preparación centrada en la platina. Mirando por fuera acerque el objetivo a la lámina, girando el tornillo macrométrico hasta que quede a una

distancia ligeramente menor de la distancia de trabajo (3 cm para 4X y 1 cm para 10X). Ahora enfoque a través del ocular subiendo lentamente el objetivo (o retirando la platina según el microscopio) hasta ver la imagen del preparado. Una vez obtenida la imagen, complete el enfoque con el tornillo de ajuste fino (micrométrico). Si es necesario, gradúe la intensidad luminosa, ajustando la apertura del diafragma y la altura del condensador (si el condensador es fijo, varíe la cantidad de luz, evite sobre iluminación).

- Enfoque visual a mayor aumento: una vez observada la preparación en menor aumento (4X y 10X), pase a posición de trabajo el objetivo de mayor aumento, girando suavemente el revólver. Si observa que la lente tropieza con la preparación, sepárela levemente del objetivo empleando el tornillo macrométrico y posteriormente proceda a acercar el objetivo a la preparación (en este caso casi pegado al cubre objeto, menos de 1mm) observando por fuera y no a través del ocular. Enfoque la imagen con el tornillo micrométrico, siempre alejando el objetivo de la preparación.
- Enfoque visual con el objetivo de inmersión (100X): teniendo la preparación enfocada en 4X, coloque una gota de aceite de inmersión sobre la laminilla (si la preparación es un extendido fijado al calor, coloque la gota de aceite de inmersión directamente sobre la lámina), posteriormente gire suavemente el revolver directamente al objetivo 100X (es decir, de 4X a 100X, SIN PASAR por 10X y 40X) y proceda como en el caso anterior, teniendo en cuenta que la distancia de trabajo es menor. Una vez realizada la observación de la preparación, limpie con el papel de arroz y alcohol isopropílico el objetivo de inmersión (4).

4. CONSULTA PREVIA

- Indique los diferentes poderes del microscopio y ¿En cuáles preparaciones es más notorio cada uno de ellos?
- ¿Cómo se determina el poder de aumento en una lupa?
- ¿Por qué se utiliza aceite de inmersión para enfoque en el objetivo 100X?
- ¿Cuánto equivale un milímetro en micras?
- Cite tres diferencias entre microscopio de luz y microscopio electrónico.
- ¿Cómo se obtiene la amplificación de un paramecio aumentado 400 veces su tamaño real?
- ¿Cuál es la unidad máxima de medida en microscopía óptica?
- Si se observa una célula usando un objetivo 45X y un ocular 12 X, ¿cuál es la amplificación del tamaño real?
- Relacione y seleccione los descubrimientos y observaciones siguientes, con el respectivo autor: Jensen, Hooke y Leeuwenhoek:
 - Protozoos, Celulosa, Microscopio
 - Células de corcho, Microscopio simple, Protozoos
 - Microscopio, Celdillas, Ameba
 - Microscopio simple, Células de corcho, Protozoos
 - Protozoos, Células de corcho, Microscopio simple

5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos	Reactivos
Trozos de papel de arroz	Aceite de inmersión
3. Goteros	Alcohol isopropílico

Materiales que debe traer el estudiante

- Elementos de bioseguridad (Bata, guantes de nitrilo, monogafas, tapabocas...etc.)
 - Toallas absorbentes.
 - Laminas portaobjetos
 - Laminas cubreobjetos
 - Bisturí
 - Papel milimetrado
5. Flores con anteras (polen)
1 hoja. Papel periódico impreso
10cm. Tela de colores

6. PROCEDIMIENTO

La práctica de microscopía se divide en dos partes (A y B), las cuales se realizarán según las necesidades del programa al cual está dirigida y criterio del docente a cargo. De esta manera los objetivos están planteados para ser cumplidos de acuerdo con dichas necesidades y según indicaciones del docente.

PARTE A

MONTAJES A REALIZAR:

1. Montaje húmedo con papel milimetrado mantequilla.
2. Montaje húmedo con granos de polen o de agua de acuario.
3. Montaje de diversos preparados.

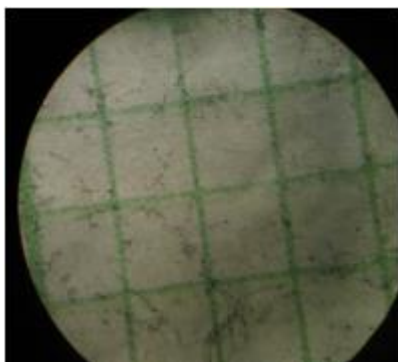


Figura 2. Montaje húmedo con papel milimetrado mantequilla
Fuente: <http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201101/curso/Microscopio.htm>

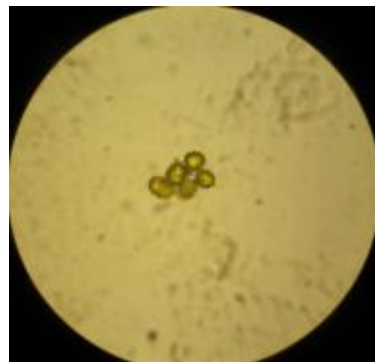


Figura 3. Montaje húmedo con granos de polen.
Fuente: <https://biologia2im6.wordpress.com/equipo-4/practicas-delequipo/practica-no-7-reproduccion-sexual/>

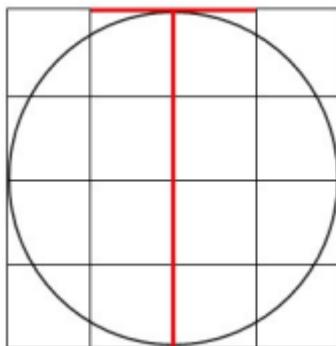
Determinación del Diámetro de Campo de Visión

Si bien el aumento total dado por el microscopio compuesto indica el número de veces en que se ha ampliado la imagen, este no informa sobre el tamaño real del objeto observado. Para determinar el tamaño real de cualquier objeto, es necesario primero determinar el diámetro del campo de visión en

cada uno de los objetivos que posea el microscopio. Por lo tanto, para calcular el diámetro de campo de visión en cada objetivo, proceda de la siguiente manera:

- Humedezca un cuadro de papel milimetrado mantequilla de 1 cm por cada lado y colóquelo sobre una lámina portaobjeto.
- Enfoque con pequeño aumento (4X). Haga coincidir una línea del papel milimetrado (puede ser la horizontal) en forma tangencial al campo de visión, mientras que con la otra línea (la vertical) la debe hacer pasar por el centro del campo de visión, formando una T (ver esquema). Como se sabe que cada lado tiene un milímetro, se puede calcular aproximadamente el diámetro, contando el número de cuadros que pasan por el centro del campo de visión, equivalente al número de milímetros.
- Calcule el diámetro total que tiene el campo de visión para dicho objetivo.
- Realice el mismo ejercicio para los demás objetivos.
- Realice las conversiones del caso y tome nota de sus conclusiones.

Ejemplo: Si usted ve cuatro cuadros, es decir, 4 mm, con un ocular 10X y un objetivo 4X, equivale a decir que, con un aumento de 40 veces, usted tendrá un campo visual de 4 milímetros de diámetro (debe utilizar la unidad de medida de microscopia: micras).



Debe tener en cuenta que la unidad de medida en microscopía es el micrómetro o micra (μ) cuya equivalencia es de 0,001 mm, por lo tanto, todas las medidas debe presentarlas bajo esta unidad.

También debe ser lo más cuidadoso y aproximado posible en la determinación del diámetro del campo de visión del objetivo 4X, porque este valor será utilizado más adelante para los cálculos con los demás objetivos (10X, 40X, 100X).

Para determinar los diámetros de campo de visión calculados (según el anexo 1) debe proceder de la siguiente manera:

- Hallar una única constante (K) multiplicando el valor de menor objetivo con su respectivo valor de diámetro observado; ej: $4x * 4000\mu \rightarrow K=16000$
- Dividir la constante (K) entre cada uno de los objetivos a los cuales se quiere hallar su respectivo diámetro de campo de visión;

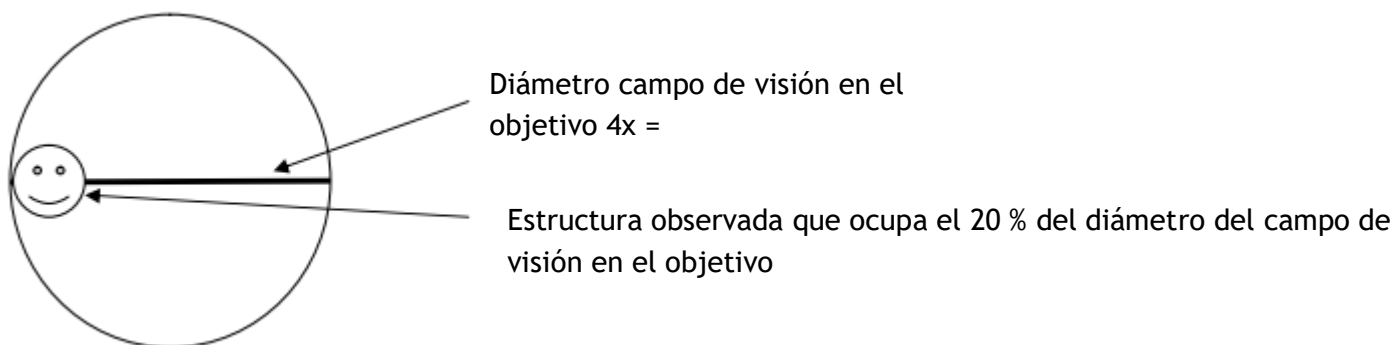
ej:

1. Objetivo 4x: $16000/4x = 4000\mu \rightarrow$ diámetro de campo de visión calculado
2. Objetivo 10x: $16000/10x = 1600\mu \rightarrow$ diámetro de campo de visión calculado
3. Objetivo 40x: $16000/40x = 400\mu \rightarrow$ diámetro de campo de visión calculado
4. Objetivo 100x: $16000/100x = 160\mu \rightarrow$ diámetro de campo de visión calculado

Para determinar el tamaño real (en micras) de cualquier estructura (letra, polen, célula, microorganismo, etc.) se procede de la siguiente manera:

- Tener en cuenta que el diámetro de cualquier objetivo se puede valorar como un 100%.
- Registre el dato en cuanto a porcentaje que ocupa la estructura observada con respecto al 100% del diámetro del objetivo en cuestión.
- Realizar una regla de tres para hallar tamaño real en micras de la estructura observada.

Ej:



$$\begin{array}{l} 100\% \rightarrow 4000\mu \\ 20\% \rightarrow X? \end{array}$$

$$\begin{array}{l} X = \frac{20\% * 4000\mu}{100\%} \\ X = 800\mu \end{array}$$

Es el tamaño real de la estructura observada en 4X

Realice los montajes respectivos con los granos de polen o el agua de acuario, según indicación del docente, (no olvide las recomendaciones anteriormente dadas en el aparte PREPARACIÓN DE UN MONTAJE HÚMEDO:

- En el centro del portaobjetos coloque una gota de agua, luego la muestra: granos de polen, cubra la muestra con una laminilla. Inicie la observación de la preparación con el objetivo de menor aumento y vaya cambiando cada vez a mayor aumento.

- Si es necesario hacer la observación en el objetivo 100X o de inmersión, hágalo con sumo cuidado siguiendo cada uno de los pasos; cualquier descuido puede conducir al daño de la lente o la lámina.
- Realice los dibujos correspondientes, grandes y claros. Si es necesario colocar nombres a las diferentes estructuras, hágalo.
- Al terminar los enfoques, humedezca el papel de arroz con alcohol isopropílico y limpie la lente (100X) con mucho cuidado.
- No olvide tener en cuenta el diámetro de campo de visión para cada objetivo para así poder determinar el tamaño de las estructuras observadas en los diferentes preparados para cada objetivo.
- Tenga en cuenta realizar descripciones detalladas de las observaciones. Luego le serán de utilidad para el análisis de los resultados.
- Diligencie la tabla de datos (anexa) en donde debe calcular diámetro de campo de visión y tamaños reales de las estructuras observadas.

PARTE B

MONTAJES A REALIZAR

1. Montaje húmedo de tela delgada con diferentes colores (tela escocesa).
2. Montaje húmedo de letra de papel periódico.
3. Montaje de diversos preparados.



Figura 4. Montaje húmedo con tela. Fuente: <http://www.microscopiosbarcelona.com/web/queobservar-y-como/empezando.htm>

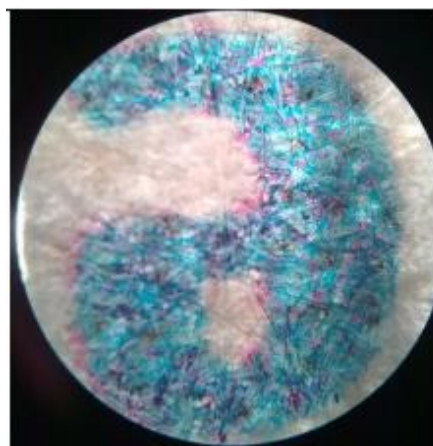


Figura 5. Montaje húmedo con letra. Fuente: <http://jheysonngilromero.blogspot.com/2012/06/laboratorio-n-2-microscopia.html>

Realice los montajes respectivos con la tela de diferentes colores, con la letra de papel periódico, (no olvide las recomendaciones anteriormente dadas en el aparte PREPARACIÓN DE UN MONTAJE HÚMEDO:

- En el centro del portaobjetos coloque una gota de agua, luego la muestra: la letra o la tela, cubra la muestra con una laminilla. Inicie la observación de la preparación con el objetivo de menor aumento y vaya cambiando cada vez a mayor aumento.
- Si es necesario hacer la observación en el objetivo 100X o de inmersión, hágalo cuidadosamente siguiendo cada uno de los pasos; cualquier descuido puede conducir al daño de la lente o la lámina.
- Realice los dibujos correspondientes, grandes y claros. Si es necesario colocar nombres a las diferentes estructuras, hágalo.
- Al terminar los enfoques, humedezca el papel de arroz con alcohol isopropílico y limpie la lente (100X) con mucho cuidado.
- No olvide tener en cuenta la magnificación de las muestras para cada montaje.
- Tenga en cuenta realizar descripciones detalladas de las observaciones. Luego le serán de utilidad para el análisis de los resultados.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. BUNGE, M. 1979. La ciencia, su método y su filosofía. Ediciones Siglo Veinte. Buenos Aires, 111 p.
2. CURTIS, H. y N. S. BARNES. 2001. Biología. 6ta Edición Español. Edit. Panamericana. Buenos Aires. • MAYR, E. 1998. Así es la biología. Editorial Debate, Madrid, 326 p.
3. PINEDA, E.B., E.L. Alvarado, F.H. de Canales. 1994. Metodología de la Investigación. Manual Para el Desarrollo del Personal de Salud. 2da Edición. Serie PALTEX para Ejecutores de Programas de Salud N. 35. Organización Panamericana de la Salud, Washington, 225

INFORME DE LABORATORIO

Integrantes:

Código:

TABLA DE RESULTADOS:

Diligencie la tabla correspondiente al anexo 1 con los datos registrados en la práctica y halle los diámetros calculados de los diferentes objetivos del microscopio; igualmente halle los tamaños reales de las diferentes estructuras observadas, anexando los procedimientos o cálculos de manera ordenada y lógica.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

A partir de los resultados de la tabla del anexo 1 analice dichos resultados relacionando tamaños de cada preparado en los diferentes objetivos, igualmente relacione resultados de tamaños de los diferentes preparados en los diferentes objetivos.

Responda las siguientes preguntas:

- ¿Se cumplieron los objetivos propuestos en la práctica?
- ¿El tamaño real de la letra es igual o diferente en los distintos objetivos? Explique
- Responda la anterior pregunta teniendo en cuenta los demás montajes
- ¿Qué relevancia tiene para la medicina el uso del microscopio?
- ¿Qué importancia tiene para la aplicación clínica conocer el tamaño real de los microorganismos o de las células?

CONCLUSIONES

Plantee 3 conclusiones en forma argumentativa con respecto a la práctica realizada

BIBLIOGRAFÍA

Ingresa la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con las normas APA