



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO

**Facultad de Ciencias Naturales
Dpto. Biología General**

BOTANICA GENERAL

Alumno/a:.....

Fecha:

MICROSCOPIA Trabajo Práctico N° 2

Objetivos:

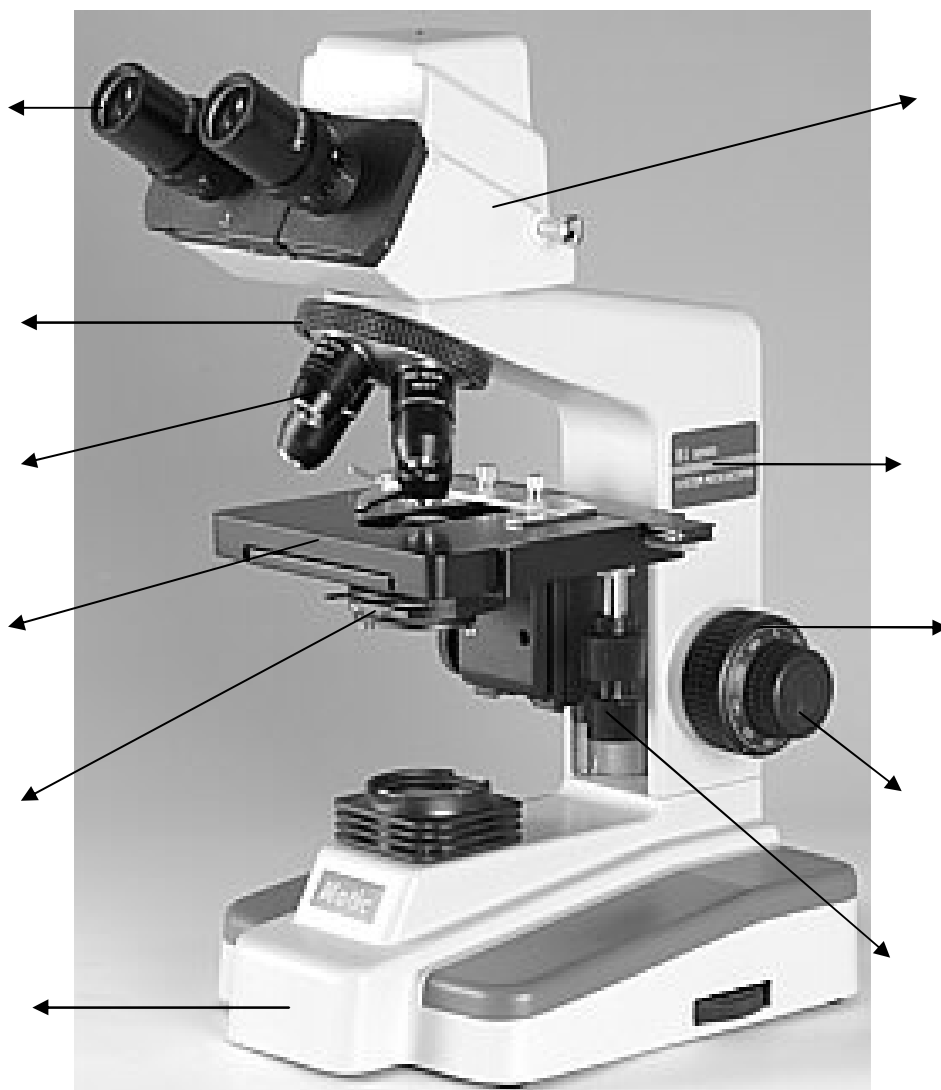
- Reconocer el material óptico a utilizar.
- Adquirir la capacidad adecuada para dibujar, ordenar e interpretar lo observado.

Palabras clave: lupa, microscopio óptico, poder de resolución, microscopios electrónicos de barrido y de transmisión, dimensiones, unidades.

ACTIVIDAD N° 1

En la siguiente figura, identifica cada una de las partes que componen al Microscopio Óptico, colocando los correspondientes nombres.

MICROSCOPIO ÓPTICO



Componentes del Microscopio óptico y sus funciones.

Parte óptica	Lente Ocular	Lente ubicada cerca de los ojos del observador, Aumenta el tamaño del objeto, generalmente es de 10x.
	Lente objetivo	Lente ubicado cerca del preparado, aumentan el tamaño del objeto, se encuentran generalmente 4 lentes de: 4x, 10x, 40x y 100x.
Sistema de iluminación	Condensador	Lente que concentra los rayos luminosos sobre el preparado.
	Diafragma	Regula la cantidad de luz que entra por el condensador.
	Fuente de luz	Encargado de iluminar el preparado, llevando la imagen hasta el lente ocular.
Parte Mecánica	Base o Pie	Es la base del MO y allí se encuentra el sistema de iluminación.
	Columna o Brazo	Continúa a la base y sobre él se encuentran los tornillos de enfoque.
	Cabezal o Cuerpo	Parte superior del Microscopio óptico donde se ubican las lentes oculares.
	Platina	Base plana, con un orificio, sobre el cual se ubica el preparado. Posee unos tornillos que permiten el desplazamiento del preparado hacia los costados y hacia adelante y atrás.
	Revolver	Dispositivo donde se disponen las lentes objetivo. Permite al girarlo cambiar los lentes objetivos.
	Tornillo macrométrico	Tornillo ubicado al costado de la columna, con el cual se desplaza verticalmente la platina, logrando un enfoque rápido.
	Tornillo micrométrico	Tornillo ubicado al costado de la columna, con el cual se desplaza verticalmente la platina, mediante un movimiento casi imperceptible; para lograr el enfoque exacto.

ACTIVIDAD N° 2

Analice las siguientes imágenes y teniendo en cuenta el fundamento teórico dado, complete:

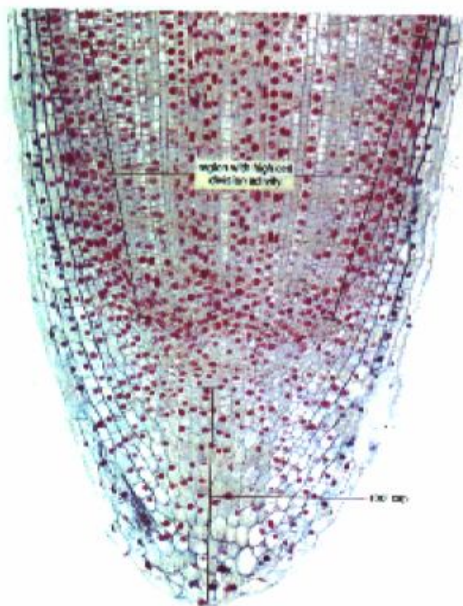


Fig.1



Figure 1b: Early prophase. Nuclear envelope intact (1 s, 1400x). (Photo by J. W. Perry)

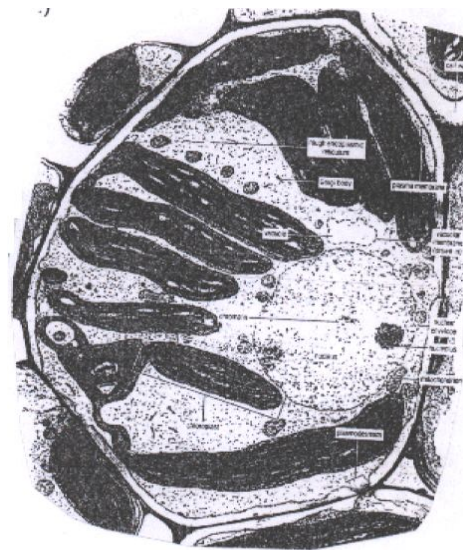
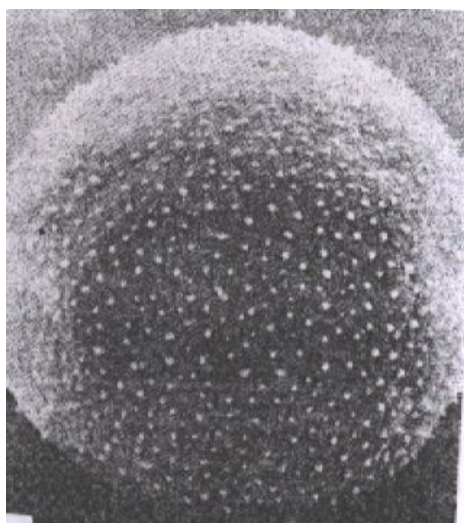
Fig.2

- ¿Cuál de ellas resulta más completa?. Fundamente.
- ¿Qué material óptico fue utilizado?

ACTIVIDAD N° 3

Según el soporte teórico dado:

- Observe las figuras que a continuación se le presentan.
- Reflexione.
- Compare y determine en el espacio previsto, si las mismas corresponden a la observación con:
 - MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (M.E.B.)
 - MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (M.E.T.)
 - MICROSCOPIO ÓPTICO (M.O.)
- Fundamente en cada caso



.....		
.....		
.....		
.....		

ACTIVIDAD N° 4:

Práctica de enfoque:

Antes de emplear el microscopio óptico lea las siguientes recomendaciones:

- Comience siempre las observaciones con el lente objetivo de aumento menor (Fig.3). Esto le dará una visión integral del preparado y le permitirá seleccionar las mejores áreas y las de especial interés, que luego observara con mayor aumento (Fig.4).
- La iluminación debe ser homogénea y de buena intensidad, pero no excesiva.
- Nunca acerque el lente objetivo al preparado si no está mirando por el costado del microscopio. Así evitara la destrucción de muestras y lentes.
- Siempre que haga una observación ajuste el enfoque con el tornillo micrométrico. Aunque el preparado haya sido enfocado por el operador más hábil, es usual que haya diferencias con respecto a otro observador.
- Recuerde que el microscopio óptico proporciona imágenes invertidas del objeto. Cuando un detalle se encuentra a la derecha del preparado, debe mover la platina hacia la izquierda y si está arriba, debe moverla hacia abajo (y a la inversa).
- Haga siempre un dibujo de la observación (Ver instrucciones para dibujar). Dibuje pocas células, en forma esquemática y respetando las relaciones de tamaño entre los distintos componentes que visualice. El esquema debe ser grande y claro. Evite sobrecargar en detalles de cuyo origen no está seguro. Es

preferible que no se registre alguna estructura, a que oscurezca su interpretación especificando grumos de colorante, burbuja de aire u otras imperfecciones del preparado

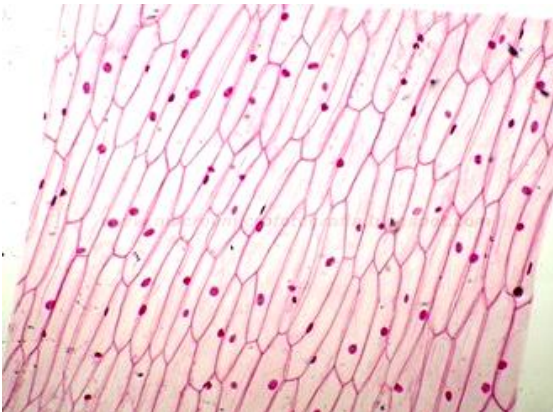


Fig. 3. Catáfila de cebolla 40X

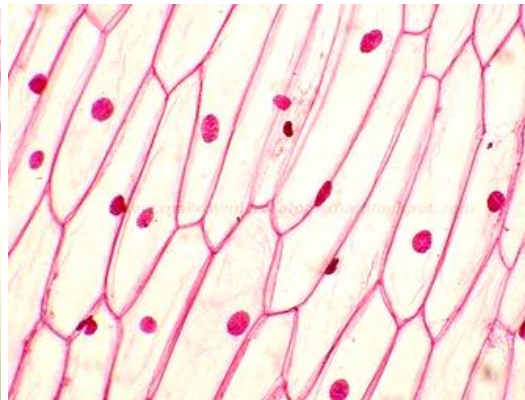


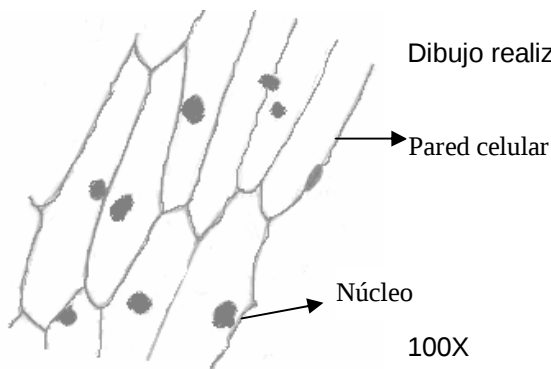
Fig. 4. Catáfila de cebolla 100X

INSTRUCCIONES PARA DIBUJAR

Se exige un buen dibujo para:

- realizar una buena observación
- poder ser corregido por otra persona
- dejar un registro de la observación realizada y que pueda ser consultado con posterioridad.

1. Antes de realizar los dibujos, observar bien los preparados e interpretar.
2. Dibujar con lápiz negro en un sólo lado de la hoja (blanca tamaño oficio).
3. Completar los datos requeridos, en tinta.
4. Dejar un margen de 2 cm. por lo menos sobre el margen izquierdo para poder encarpetarlos.
5. Titular los dibujos y colocar el aumento con que se trabajó.
 - * No llenar la hoja con dibujos, dejar espacios que faciliten la comprensión.
6. Resolver las conclusiones que cada trabajo práctico requiera, con la ayuda de bibliografía.



Dibujo realizado utilizando un aumento total de 100x (Fig. 4)

Procedimiento para el enfoque de preparados histológicos:

1. Encender la fuente de luz, para que el campo óptico quede iluminado.
2. Colocar el preparado sobre la platina sujetándolo con las pinzas.
3. Ubicar el lente objetivo de menor aumento en posición de observación, es decir, por encima del preparado.
4. Subir la platina haciendo girar el tornillo macrométrico, mientras controlas que se acerque al lente objetivo, sin tocarlo.
5. Mirar por los lentes oculares y bajar lentamente la platina con el tornillo macrométrico hasta observar el preparado, mover lentamente el tornillo micrométrico hasta lograr una imagen nítida.
6. Para observar la misma imagen con mayor aumento, bajar la platina con el tornillo macrométrico y cambiar el lente objetivo haciendo girar el revólver.

7. Subir nuevamente la platina observando que el lente objetivo no toque al preparado, mirar por los lentes oculares y proceder nuevamente a enfocar.
8. Al terminar de observar, bajar la platina, colocar el lente objetivo de menor aumento, retirar el preparado y apagar la fuente de luz.

A- Materiales: - Agua estancada

Procedimiento

- Coloque una gota de agua estancada, en el centro del portaobjeto.
- Cubra con un cubreobjeto.
- Extraiga el excedente de agua con la ayuda de un papel absorbente.
- Observe con el menor aumento.
- Observe con el mayor aumento.
- Haga un esquema de lo observado.

B- Enfoque el material presentado (Preparado de Histología vegetal)

- Esquematice

ACTIVIDAD Nº 5

- Enfoque el material presentado por la cátedra, en la lupa binocular.
- Realice el dibujo correspondiente.

ACTIVIDAD Nº 6

- En la columna de la izquierda figuran una serie de elementos.
En el espacio punteado aclare si la observación de dicho objeto la realizaría con:

(a) M.E.T. (b) M.E.B. (c) M.O. (d) LUPA

- | | |
|---|-------|
| 1) Detalle de la superficie celular | |
| 2) Ojos de insectos | |
| 3) Ribosomas aislados | |
| 4) Partes florales de una flor | |
| 5) Estructura interna de una célula procarionte | |

Anexo Teórico: MICROSCOPIA

INTRODUCCIÓN:

La principal limitación que presenta el estudio de las células y sus partes integrantes, es el reducido tamaño que poseen. Esta característica dificulta tanto el análisis a nivel de la estructura como del funcionamiento celular. De acuerdo con determinaciones ópticas, las células que pueden ser observadas a simple vista son aquellas cuyo diámetro sea mayor a 0,1 mm., porque están en el límite por debajo del cual un ojo normal en condiciones óptimas no alcanza a visualizar ni siquiera un punto.

Las limitaciones determinaron que se recurriera a elementos ópticos con el fin de magnificar la imagen del objeto para su observación.

A. INSTRUMENTOS OPTICOS

A.a. MICROSCOPIO ÓPTICO

El **MICROSCOPIO ÓPTICO** (del griego micro: pequeño y *skopein*: observar) es el instrumento que sirve para visualizar estructuras pequeñas, cuyas dimensiones son inferiores al límite del poder de resolución del ojo humano. El poder de resolución es la capacidad de poder separar 2 puntos muy próximos y dar de ellos imágenes claras y definidas. El ojo humano tiene un poder de resolución de 100 μm (0,1mm) es decir que 2 puntos que se encuentran separados entre sí por una distancia menor que 0,1 mm se ven como uno solo.

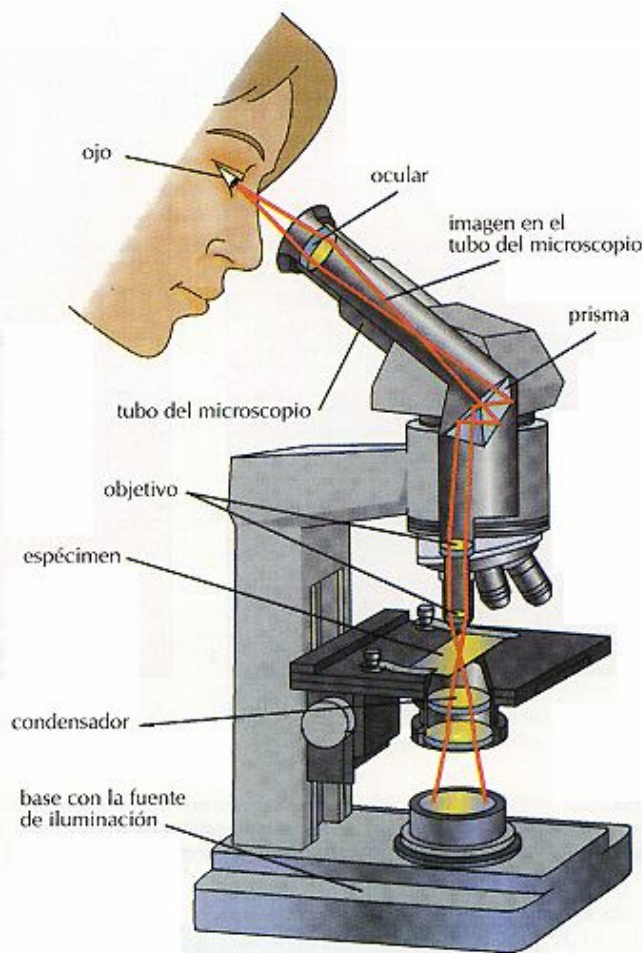
En síntesis, el microscopio actúa como un separador de puntos. El poder de resolución de un buen microscopio óptico es aproximadamente igual a 0,2 μm . Un microscopio óptico está formado por una parte mecánica, una parte óptica y un sistema de iluminación. La **parte mecánica** consta del pie, de la columna, de la platina, de los tornillos macro y micrométricos, del revolver. El **sistema óptico** está formado por las lentes oculares, las lentes objetivos.

Tanto los oculares como los objetivos tienen distintos aumentos, siendo de 10X para los oculares y de 4X, 10X, 40X y 100X, para los objetivos; este último objetivo es el llamado objetivo de inmersión. El objetivo de inmersión debe ser utilizado con aceite de cedro (por eso se llama de "inmersión", a diferencia con los otros objetivos de menor aumento que utilizan aire, por lo que se denominan objetivos "secos") y al enfocar la imagen la lente frontal del objetivo esta casi tocando el cubreobjeto, a diferencia de los otros objetivos donde la distancia frontal es mayor.

Debajo de la platina se encuentra el sistema de iluminación: la lámpara, el diafragma y el condensador.

La imagen se forma debido a los rayos luminosos provenientes de la lámpara que atraviesa el diafragma, llegan al condensador que los concentra y proyecta sobre el objeto a observar a través de la abertura de la platina. El objetivo recoge estos haces y proyecta una imagen aumentada, real e invertida que se forma dentro del tubo la cual es captada por la lente ocular y finalmente se forma en la retina del observador la imagen del objeto de estudio.

El límite de resolución del microscopio es la distancia mínima a partir de la cual ya no es posible distinguir la separación entre 2 puntos.



A.b. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (M.E.T.)

El **M.E.T.** es el único instrumento que permite conocer directamente la ultraestructura biológica ya que posee un poder de resolución mucho mayor que el M.O. Utiliza como fuente luminosa un haz de electrones.

El poder de resolución es tan alto que la imagen del objeto puede aumentarse muchísimo. Actualmente se logran resoluciones hasta 1,4 Å y se obtienen aumentos entre 750.000 y 1.000.000.

A.c. MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (M.E.B.)

Su utilidad es semejante a la de la lupa pero muy superior en cuanto a poder de resolución, profundidad de campo y magnificación de la imagen. Permite la observación y el análisis de superficies por medio de imágenes que se obtienen mediante un sistema óptico electrónico. La visualización de las imágenes es en una pantalla de TV o a través de fotografías.

CUADRO COMPARATIVO ENTRE EL M.O. Y EL M.E.

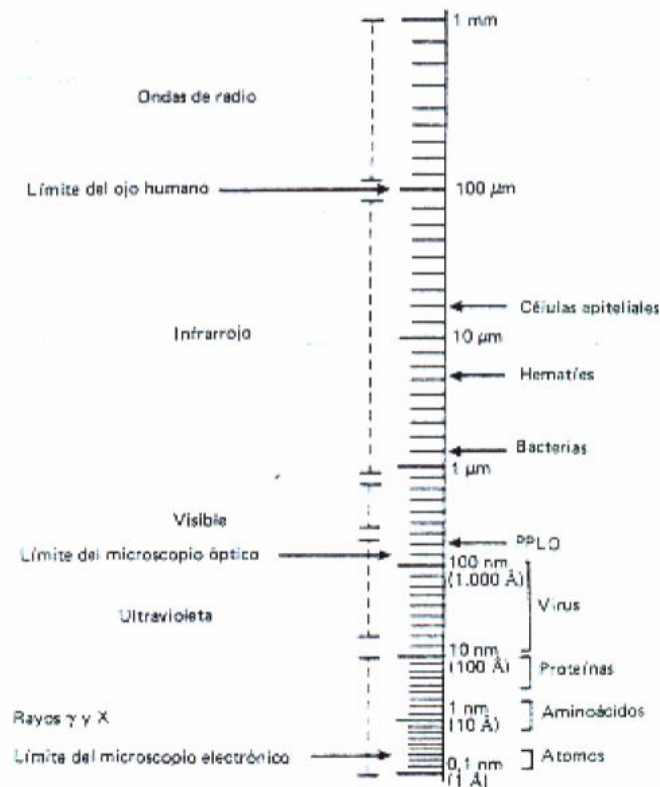
	<i>MICROSCOPIO OPTICO</i>	<i>MICROSCOPIO ELECTRONICO</i>
Fuente luminosa	Rayos luminosos (haz natural o artificial)	Haz de electrones
Preparado	Material biológico entre porta y cubreobjeto	Material biológico ultrafino sobre una grilla
Condensador, objetivo, ocular	Sistema de lentes de cristal	Bobinas electromagnéticas (generan campos magnéticos)
Imagen	Se ve directamente a través del ocular	Se vé en una pantalla o en una placa fotográfica
Entre las estructuras hay ...	Aire	Vacío
Obtención de la pieza	2 cm. de lado y 4-5 cm. de ancho	No más de 1 mm. de ancho
Fijación	F.A.A.	Glutaraldehido y/o tetróxido de osmio
Inclusión	Parafina	Resinas de Epoxi
Corte	Micrótomos (cortes de un espesor de 2 a 15 µm.). Se utilizan cuchillas de acero	Ultramicrótomo (cortes de 0,1 a 0,02 µm). Se utilizan cuchillas de diamante o cristal.
Montaje	Portaobjeto de vidrio	Grilla de cobre
Coloración	Colorantes naturales o sintéticos.	No existe coloración. Es un método de contraste con metales pesados.
Condición del material biológico	Vivo o muerto	Muerto.

A.d. LUPA - MICROSCOPIO ESTEREOSCOPICO

Se emplea para objetos macroscópicos. No invierte la imagen. Puede usarse para objetos opacos que no vayan montados sobre portaobjetos. Siempre que se estudia un objeto determinado debe hacerse en forma progresiva desde lo macroscópico a lo microscópico; es decir primero a simple vista, luego con lupa o con microscopio óptico y finalmente si es necesario con microscopio electrónico.

Con la lupa sólo se observan superficies, ésta permite una visión tridimensional de los objetos y la diferenciación de sus colores, pero no se obtienen aumentos mayores de 100 µm.

ESCALA LOGARÍTMICA DE LAS DIMENSIONES MICROSCÓPICAS



Cada división principal representa un tamaño diez veces menor que la precedente. A la izquierda se indica la posición de las diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético y los límites del ojo humano, la luz y el microscopio electrónico. A la derecha se da el tamaño de diferentes células y átomos (según De Robertis y otros, 1977).

UNIDADES DE USO CORRIENTE EN MICROSCOPIA

FACTOR	PREFIJO	ABREVIATURA
10^{-3}	mili	mm
10^{-6}	micro	μm
10^{-9}	nano	nm

Equivalencias en el sistema métrico para longitud

$$1\text{m} = 10^1 \text{ dm} = 10^2 \text{ cm} = 10^3 \text{ mm} = 10^6 \mu\text{m} = 10^9 \text{ nm} = 10^{10} \text{ \AA}$$

$$1 \text{ dm} = 10 \text{ cm} = 10^2 \text{ mm} = 10^5 \mu\text{m} = 10^8 \text{ nm} = 10^9 \text{ \AA}$$

$$1 \text{ cm} = 10 \text{ mm} = 10^4 \mu\text{m} = 10^7 \text{ nm} = 10^8 \text{ \AA}$$

$$1 \text{ mm} = 10^3 \mu\text{m} = 10^6 \text{ nm} = 10^7 \text{ \AA}$$

$$1 \mu\text{m} = 10^3 \text{ nm} = 10^4 \text{ \AA}$$

$$1 \text{ nm} = 10 \text{ \AA}$$

Inversamente:

$$1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm} (10^{-1} \text{ nm}) = 10^{-4} \mu\text{m} = 10^{-7} \text{ mm} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$1 \text{ nm} = 10^{-3} \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ mm} = 10^{-9} \text{ m}$$

$$1 \mu\text{m} = 10^{-3} \text{ mm} = 10^{-6} \text{ m}$$

$$1 \text{ mm} = 10^{-3} \text{ m}$$

BIBLIOGRAFIA

- Castro R. C. et al. Actualizaciones en Biología. 1.983. Ed. EUDEBA
- www.joseacortes.com/practicas/microscopio.htm