

# ARTÍCULO

## CONTRIBUCIONES DE LA FÍSICA EN LA HISTORIA DE LA MICROSCOPIA

*Dr. Jesús A. Arenas Alatorre*

*Investigador asociado "C", Responsable de Vinculación del Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física UNAM.*

e-mail [jarenas@fisica.unam.mx](mailto:jarenas@fisica.unam.mx)

## CONTRIBUCIONES DE LA FÍSICA EN LA HISTORIA DE LA MICROSCOPIA

Dr. Jesús A. Arenas Alatorre

Investigador asociado "C", Responsable de Vinculación del Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física UNAM.

e-mail [jarenas@fisica.unam.mx](mailto:jarenas@fisica.unam.mx)

### RESUMEN

En este artículo se hace una semblanza de la historia de la microscopía desde que el hombre tuvo la capacidad de razonar hasta nuestros días, en los que el hombre ha logrado manipular átomos y células. Se destaca la labor de grandes físicos que han contribuido, tanto con sus trabajos teóricos como experimentales, en el desarrollo de las técnicas de microscopía óptica, electrónica, de tunelaje y de fuerza atómica. Así mismo, se describe de manera sencilla y breve las principales características de cada una de estas técnicas y algunos logros que han sido fundamentales en el conocimiento de los seres vivos y de los materiales. Por último se hace recomendación de algunos artículos y páginas electrónicas que el lector puede consultar para profundizar en cada una de las técnicas abordadas.

**Palabras clave:** Historia microscopía, SEM, TEM, STM, AFM, microscopía de contraste de fase, microscopía confocal.

### THE PHYSICS IN THE MICROSCOPY HISTORY

#### ABSTRACT

In this paper is presented the history of the microscopy since the man had the capacity to reason until our days, in which the man has been able to manipulate atoms and cells. It is also commented the work of great physics that have contributed so much with either their theoretical and experimental works for the development of techniques such as: light, electron, tunneling and atomic force microscopy. It is described the main characteristics of each of these techniques and some achievements, fundamentaly in the knowledge of biology, medicine and materials science. Finally, it is recommended some specialized literature and internet pages that the reader can consult in order to know more of these approached techniques.

**Keywords:** microscopy history, SEM, TEM, STM, AFM, phase contrast microscopy, confocal microscopy

#### Introducción

La asamblea general de las naciones unidas declaró al año 2005, como el Año Internacional de la Física, en reconocimiento al primer centenario de las publicaciones de la relatividad de Albert Einstein consideradas base tanto de la física moderna como de grandes descubrimientos científicos, pilares del desarrollo tecnológico actual. Dentro de estos descubrimientos y desarrollos está el de la microscopía en sus diferentes modalidades (óptica, confocal, electrónica, de tunelaje y de fuerza atómica). Tal ha sido el impacto de estas tecnologías que cuatro de sus diseñadores fueron galardonados con el Premio Nobel de Física: Fritz Zernike, en 1935, por el

desarrollo del microscopio de contraste de fase; Ernst Ruska (diseñador del primer microscopio electrónico) y Gerd Benning y Heinrich Rohrer (diseñadores del primer microscopio de barrido por tunelaje), en 1986. De la misma manera, la humanidad reconoce también la genialidad y aportes realizados al desarrollo de la microscopía, de: Zacharias Jensen (1580-1638), Robert Hook (1635-1703), Galileo Galilei (1564-1662), Christiaan Huygens (1629-1695), Ernst Abbe (1840-1905), Carl Zeiss (1816-1888) entre otros. En honor a estos grandes científicos, usuarios y conocedores de la física óptica, se presenta en este artículo una cronología del desarrollo de la microscopía y sus aportes a la humanidad.

## Las Primeras Observaciones

Los antiguos habitantes del planeta observaron que una gota de agua y materiales curvos transparentes, amplificaban el tamaño de las imágenes de los objetos, sin embargo aún no contaban con los medios tecnológicos y científicos para comprender y hacer uso de tal fenómeno, y así poder desarrollar una tecnología en su beneficio. Fue hasta el siglo XVII cuando se iniciaron las primeras experiencias con artefactos de vidrio en forma de lenteja, dándoles por ello el nombre de lentes. Con éstos observaban un aumento en la imagen de los objetos, fenómeno que fue muy apreciado por diversos comerciantes, tales como joyeros y mercaderes de tejido con la finalidad de observar la calidad de los productos. Fue Galileo Galilei (1564-1662) al primero a quien se le acreditó el uso científico de las lentes al hacer observaciones astronómicas.

Entre los años de 1591 y 1608, el físico holandés Zacharias Jensen construyó el primer microscopio compuesto, constituido por varias lentes que permitieron corregir las aberraciones esférica y cromática. Este microscopio consistía de un lente objetivo convexo y un ocular cóncavo (figura 1). Posteriormente Johannes Kepler (1571-1630) diseñó un microscopio compuesto en que el objetivo y el ocular eran del tipo convexo; éste es el prototipo de los microscopios actuales (Lanfranconi, 2001; Radl 1988).

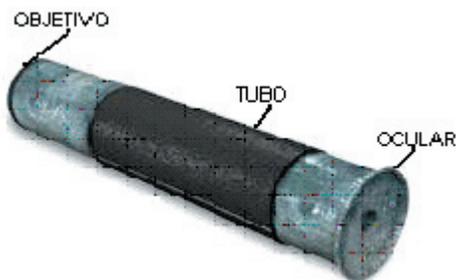


Fig 1.- Primer microscopio óptico diseñado por el físico holandés Zacharias Jensen

Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723), trabajando en un negocio de tejidos, se interesó por el aspecto que tenían las cosas cuando las veía bajo aumento y comenzó a trabajar en el tallado de los vidrios para mejorar las imágenes que observaba, logrando amplificar hasta 270 veces. Diversos tipos de materiales pasaron por sus microscopios (musgos, leche, agua, abejas, etc.), siendo el primero en observar (1675) los infusorios (microorganismos observados en aguas estancadas). Sus instrumentos cobraron fama y se convirtieron en un gran atractivo para la gente, incluyendo reyes.

Uno de los descubrimientos más importantes y de gran impacto en la historia de observación biológica y médica se produce en 1665, cuando Robert Hook, médico inglés, utilizando un microscopio óptico rudimentario, reportó que todos los seres vivos están formados por unidades estructurales de vida a las que llamó "celdas" o "células".

Mientras, descubrimientos similares con el uso del microscopio óptico se iban dando a conocer, paralelamente se fue desarrollando la teoría de la óptica, destacando el trabajo desarrollado por Christiaan Huygens (1629-1695), científico que construyó instrumentos mucho más poderosos que los de Galilei, obteniendo imágenes más nítidas con un nuevo método de pulido de lentes. Logró construir un refractor de 70 metros de distancia focal y abertura de sólo 23 centímetros. A diferencia del microscopio de Kepler que consistía en una lente simple plano-convexa, el ocular de Huygens tenía dos lentes plano-convexas, una de mayor diámetro y distancia focal o lente de campo y una segunda de menor diámetro y de distancia focal igual a la mitad de la lente de campo, llamada "lente de ojo". Entre sus desarrollos científicos destaca el principio que lleva su apellido, el cual establece que todo punto de un frente de ondas que avanza, actúa como una fuente de nuevas ondas. Si se conoce el estado de un frente de ondas en un instante, se puede explicar su avance. A partir de este principio se desarrolló la teoría ondulatoria de la luz. En su obra más conocida, "El Tratado de la Luz", enunció los principios de la reflexión y refracción de la luz, marcando el inicio de una nueva era en el estudio de la óptica (Lanfranconi, 2001; Radl 1988).

Otros grandes científicos que aportaron mucho a la humanidad por sus observaciones en el microscopio, pero que sería muy extenso describir en detalle sus contribuciones fueron: Jan Swammerdam (reportó que la sangre no es un líquido uniforme y que estaba compuesta de corpúsculos que dan su color rojo); Marcelo Malpighy (descubrió que las arterias y las venas se hallaban unidas por una red de vasos, conocidos ahora como capilares). Como se puede apreciar, los primeros grandes descubrimientos científicos que se realizaron con la ayuda de un microscopio fueron en el área biológica y médica.

## **Microscopio de Contraste de Fase**

Hasta mediados del siglo XX un gran número de microscopios de luz habían salido al mercado, destacando los microscopios de la firma Carl Zeiss, debido a la colaboración entre Ernst Abbe y Zeiss. Esta firma logró la producción de microscopios de gran calidad, gracias a la aplicación de la teoría de formación de imágenes de Abbe, diseñando por primera vez un microscopio basado en cálculos matemáticos y conocimientos de óptica geométrica. No obstante ello, se presentaban problemas muy grandes al tratar de observar muestras transparentes a la luz visible, como es el caso de algunos seres vivos.

En el año 1935, el físico holandés Fritz Zernike desarrolló el Microscopio de Contraste de Fase, con lo cual se le otorgó el Premio Nobel de Física en el año 1953. Su contribución consistió al afirmar que la imagen vista bajo un microscopio convencional, es formada por el objetivo del microscopio, y finalmente se observa en el ocular. Si la muestra no absorbe la luz, no habrá esencialmente contraste en la imagen visible (será toda blanca); por ejemplo, la mayoría de las células vivas absorben poca luz (a excepción de las células rojas de la sangre y los cloroplastos) y por lo tanto, son difíciles de visualizar a través de un microscopio convencional. Por otro lado, aunque las células absorben poca luz, tienen diversos espesores y diversos índices de refracción en sus partes, lo que conduce a las diferencias de fase de las ondas de luz que pasan a través de ellas. La fase de un haz de luz es inobservable a la vista (apenas se ve la intensidad, no la fase). Zernike calculó la manera de hacer que las diferencias de fase se observaran en la imagen como diferencias en la intensidad, logrando así, visualizar detalles que no eran posibles apreciar en un microscopio convencional. Este tipo de microscopios se utiliza habitualmente para estudiar células vivas. En la figura 2 se muestra una foto de Fritz Zernike (1888-1966) y el diseño de un microscopio de contraste de fase (Gundlach, 2003; Locquin, M y Langeron, M. 1985).

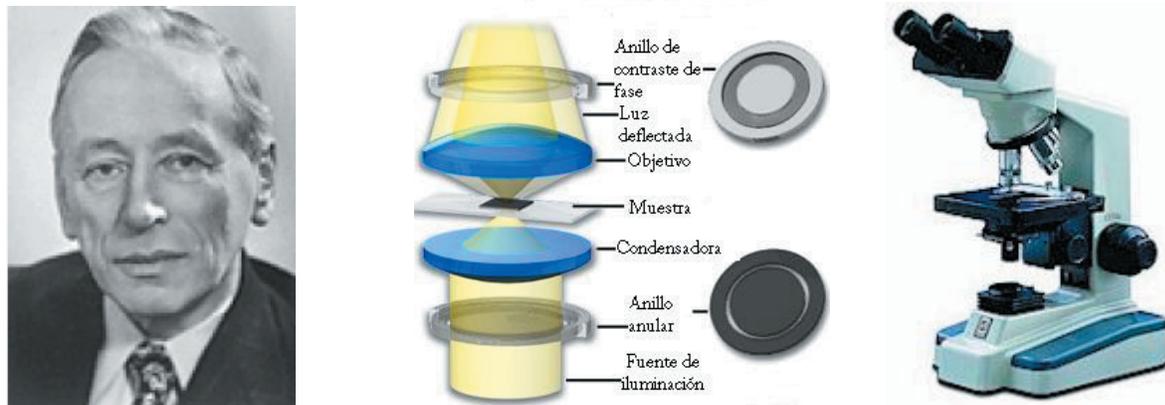


Fig 2.- Fritz Zernike (1888-1966), la óptica de microscopio de contraste de fase y un microscopio moderno de contraste de fase.

## Microscopía Confocal

La microscopía confocal es una técnica relativamente nueva que está logrando excelentes resultados en diversas ramas de la ciencia (medicina, biología, materiales, geología, etc). Aunque el principio de la microscopía confocal fue dado a conocer por Minsk en 1957 y los primeros microscopios basados en esta técnica demostraron su validez en 1968, gracias a los trabajos de Petran y colaboradores; su gran aceptación tuvo lugar hasta hace unos pocos años con el desarrollo de los láseres y equipos de cómputo. Su éxito se debe a las ventajas que ofrece frente a la microscopía óptica convencional (imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal, etc) y sobre todo, a la posibilidad de obtener imágenes que permiten su estudio tridimensional (Soto Eguibar, 1993)

El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores (Boyde, 1988). La luz procedente de un láser es reflejada mediante un espejo dicróico, y con la lente de un objetivo es enfocada en un punto de la muestra. La señal emitida por el punto iluminado (fluorescencia o luz reflejada) vuelve por el mismo camino óptico, pasando a través del espejo dicróico y enfocada en un fotomultiplicador. Por último, un diafragma o "pinhole" es colocado delante del fotomultiplicador para eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco, aumentando con ello la claridad y resolución de la imagen, principalmente en aquellas muestras que tienen diferentes grosores o índices de refracción; en particular los bordes de cualquier estructura. En la figura 3 se muestra un microscopio confocal moderno, su arreglo óptico y una imagen obtenida de neuronas (Wilson *et al.* 1994).

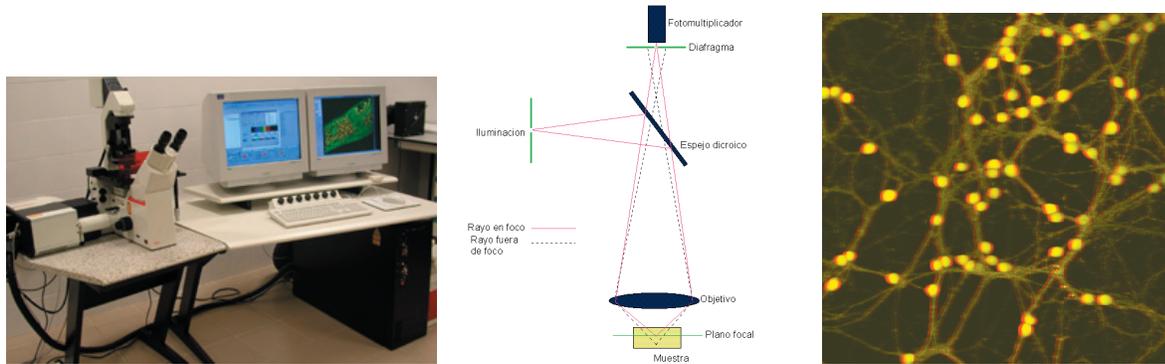


Fig. 3.- Microscopio confocal moderno, su diseño óptico y una imagen de neuronas.

La microscopía confocal permite también estudiar los especímenes usando luz transmitida o reflejada; ello implica que se puedan estudiar muestras que por su grosor o por sus características, no son transparentes. Con ello se han logrado desarrollar nuevas técnicas de preparación de muestras, sin implicar el corte en rebanadas delgadas como se hacía anteriormente, logrando incrementar las posibilidades de estudiar las relaciones estructura-función, ya sea a nivel uni o multicelular.

## Microscopía Electrónica

El desarrollo de la microscopía óptica o de luz fue evolucionando de manera importante desde su aparición a principios del siglo XVII, y manteniéndose como pilar fundamental del conocimiento de aquello invisible a la vista del ser humano; sin embargo, su límite de resolución de aproximadamente un micrómetro  $10^{-6}$  m, ya no fue posible mejorarlo debido al factor limitante de la longitud de onda de la luz (450-640 nm).

Fue hasta el año de 1931 cuando se alcanzó a obtener, con la ayuda de otra generación de microscopios, una resolución 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico; a ésta generación se le conoce como Microscopía Electrónica y fueron los físicos Max Knoll y Ernst Ruska en Alemania, quienes dieron a conocer el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Posteriormente, en el año 1938, Manfred von Ardenne construyó el primer Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y comercialmente distribuido hasta 1965 por la compañía británica, Cambridge Instruments. En la figura 4 se muestran tres fotografías, en la primera, Ruska y Knoll construyendo el primer microscopio electrónico de transmisión; en la segunda, un moderno microscopio electrónico de transmisión de emisión de campo; y finalmente un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío (Freundlich, 1994).



Fig. 4.- Ruska y Knoll construyendo el primer TEM; TEM de emisión de campo; SEM de bajo vacío moderno.

El desarrollo de la microscopía electrónica permitió, entre otras cosas, alcanzar el nivel de resolución espacial que muchos investigadores de diversas disciplinas demandaba, y fundar una rama de investigación que a pesar de ser relativamente joven, ha avanzado de una manera vertiginosa en la ciencia contemporánea. Esta técnica se ha convertido en una fuente inagotable de información y desarrollo, no solo por la resolución alcanzada, sino también por las capacidades de análisis de las técnicas asociadas a un microscopio electrónico moderno, como son la espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS de sus siglas en inglés “*Energy Dispersive Spectroscopy*”), la espectroscopía por dispersión de longitud de onda (WDS, del inglés “*Wavelength Dispersive Spectroscopy*”) y la espectroscopía Auger, entre otras. Por su capacidad de proporcionar información morfológica, topográfica, química, cristalina, eléctrica y magnética de los materiales, la han convertido en herramientas indispensables en el dominio de la física del estado sólido, ciencia de materiales, electrónica, polímeros, metales, textiles, biología, medicina, etc. El futuro de esta técnica es muy prometedor debido a su desarrollo tecnológico en la última década del siglo XX, alcanzando un poder de resolución de hasta 0.1 nm en un TEM y 1.5 nm en un SEM, éste último con la posibilidad de trabajar a presión controlada, útil en la observación de muestras húmedas (Díaz G y Arenas J., 2003).

La diferencia principal entre microscopía electrónica y óptica es el uso de un haz de electrones en lugar de luz para enfocar la muestra, consiguiendo aumentos de hasta dos millones de veces ( $10^6 \times$ ). Su diseño se basa en dos principios físicos, uno es el de dualidad onda-partícula predicha por Louis de Broglie en 1924, quien dedujo una ecuación ( $\lambda = h/p$ ; h es la constante de Planck) que permite calcular la longitud de onda ( $\lambda$ ) esperada para una partícula de masa m con momentum p ( $p=mv$ ). En microscopía electrónica m representa la masa de un electrón y  $\lambda$  adquiere valores en el intervalo 0.388 – 0.00193 nm, dependiendo del voltaje de aceleración de los electrones.

El otro principio físico en el que se basa el diseño de un microscopio electrónico es el de la ley de Lorentz ( $F= e(v \times B)$ ), lo cual indica para este caso, que un electrón viajando con velocidad  $v$  dentro de un campo magnético  $B$ , experimenta una fuerza que hace que el electrón describa una trayectoria helicoidal alrededor de las líneas del  $B$ . De esta manera un microscopio electrónico está constituido por lentes electrostáticas y electromagnéticas que desempeñan el mismo papel que una lente de vidrio para el caso de un microscopio de luz (Yacamán y Reyes, 1995).

En la figura 5 se muestra el diseño óptico de un TEM; una imagen de alta resolución de una interfase bimetalica Ni-Pt y un patrón de difracción de un material cristalino.

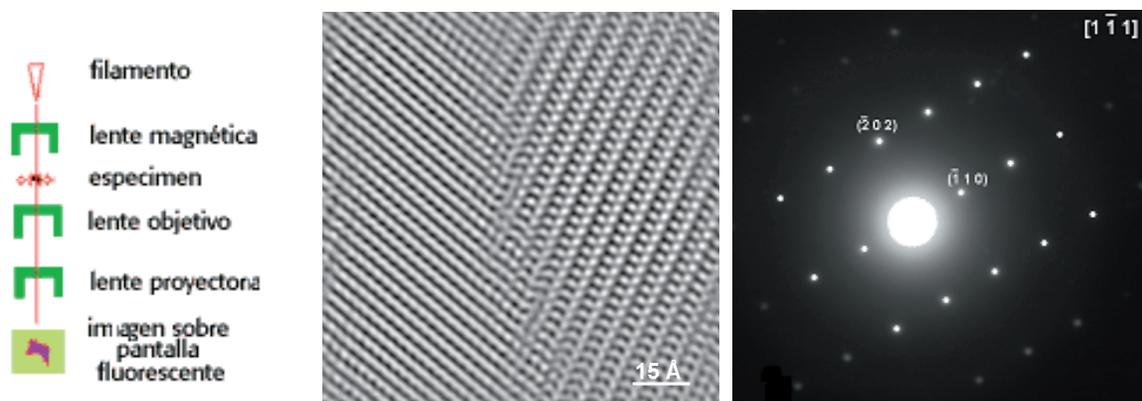


Fig. 5.- Diseño óptico de un TEM; imagen con resolución atómica de una aleación Ni-Pt y un patrón de difracción

En la figura 6 se presenta la óptica de un SEM y dos imágenes típicas obtenidas por esta técnica del ojo de

una mosca y de microorganismos en papel antiguo.

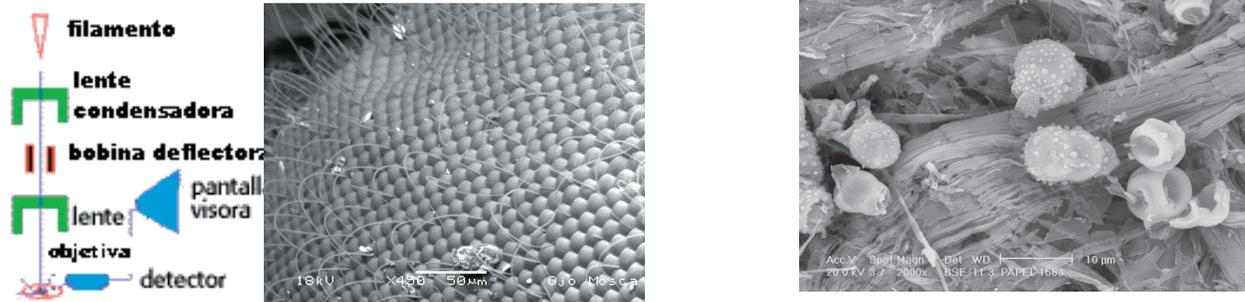


Fig. 6.- Óptica de un SEM, imagen del ojo de una mosca obtenida a 450X y de microorganismos en papel antiguo a 2000X.

En el área biológica, grandes descubrimientos se han dado a conocer con el uso de estos microscopios, destacando los trabajos de Claude y Palade, quienes en 1974 recibieron el Premio Nobel de Biología por sus estudios celulares. Con este tipo de microscopio fueron observados por primera vez, el ADN y diferentes tipos de virus.

### Microscopía de Barrido por Tunelaje y de Fuerza Atómica

El Microscopio de Barrido por Tunelaje (STM por sus siglas en inglés) fue desarrollado en 1981 por Gerd Benning y Heinrich Rohrer en los laboratorios de IBM de Zurich, Suiza. Ello les valió el Premio Nobel de Física, en 1996.

El potencial de la técnica es enorme dado la posibilidad de obtener imágenes de superficies metálicas a escala atómica. Debido a la capacidad de proporcionar un perfil tridimensional de la superficie de la muestra es muy útil en la caracterización de agregados, textura y defectos superficiales de los metales. Su uso abarca únicamente el estudio de materiales conductores y su nombre se debe a que se utiliza el efecto túnel para generar la imagen. Este efecto puede ser explicado a partir de los conceptos cuánticos de dualidad onda-partícula y el principio de incertidumbre de Heisenberg. Para entender este fenómeno, considere por ejemplo el balanceo de una bola en una colina con subidas y bajadas sin fricción, según lo mostrado en la figura 7. Suponga que la bola está sostenida momentáneamente y se suelta de la posición A, ésta rodará cuesta abajo y subirá la colina hacia la posición C; sin embargo nunca podrá llegar a una altura mayor que su punto de origen (A), así que llegará a la posición B, y oscilará entre dichos puntos para siempre. No hay forma por la cual la bola pueda pasar a la posición D dentro del dominio de la mecánica newtoniana, pero esto es exactamente lo que ocurre en el dominio de la mecánica cuántica. La bola puede rodar cuesta abajo en la otra cara de la colina, después de subir hasta la posición B, ésta se materializa en la otra cara (D), esto se denomina efecto túnel en la mecánica cuántica. En un STM dos metales (punta piezoeléctrica detectora y metal a analizar) separados por un vacío, se aproximan a esta situación, en la cual electrones del metal en estudio juegan el papel de las bolas y el vacío representa el punto C. Los electrones no tienen la suficiente energía para escapar a través del vacío, pero puede haber intercambio de electrones entre ambos metales por efecto túnel si éstos se encuentran suficientemente próximos. La probabilidad de que esto suceda es grande debido a que los electrones son partículas de radio mucho menor a un picómetro ( $10^{-12}$  m). La imagen se forma al barrer la punta detectora del STM la superficie del metal, tal como se representa en la figura 8 (Horton *et al.*, 2003).

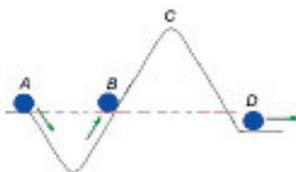


Fig. 7.- Esquema de esferas deslizándose en un pozo para explicar el efecto túnel

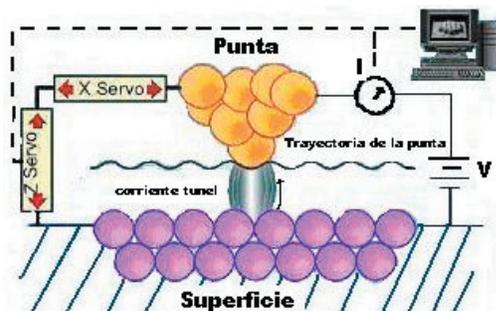
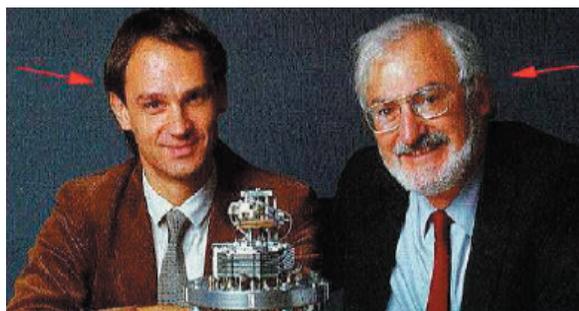


Fig 8.- Benning y Rohrer mostrando el STM y esquema de su funcionamiento

Más tarde, en 1985 Benning y Rohrer nuevamente construyeron el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM); instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los nanonewtons. Al analizar una muestra, se registran las diferencias de altura entre el objeto de estudio y una punta cristalina de forma piramidal acoplada a un listón microscópico, muy sensible al efecto de las fuerzas y de sólo unos 200  $\mu\text{m}$  de longitud.

La fuerza atómica es detectada cuando la punta está muy próxima a la superficie de la muestra, entonces es posible registrar la pequeña flexión del listón mediante un haz láser reflejado en su parte posterior. Un sistema auxiliar piezoeléctrico desplaza la muestra tridimensionalmente, mientras que la punta recorre ordenadamente la superficie. Todos los movimientos son controlados a través de una computadora. La resolución del instrumento es de aproximadamente 0.2 nm ( $10^{-9}$  m), y la pantalla de visualización permite distinguir detalles en la superficie de la muestra con una amplificación de varios millones de veces. Finalmente en la figura 9 se presenta el esquema del funcionamiento de un AFM y dos imágenes de partículas de Au obtenidas por esta técnica (Wolf y Pauler, 1999).

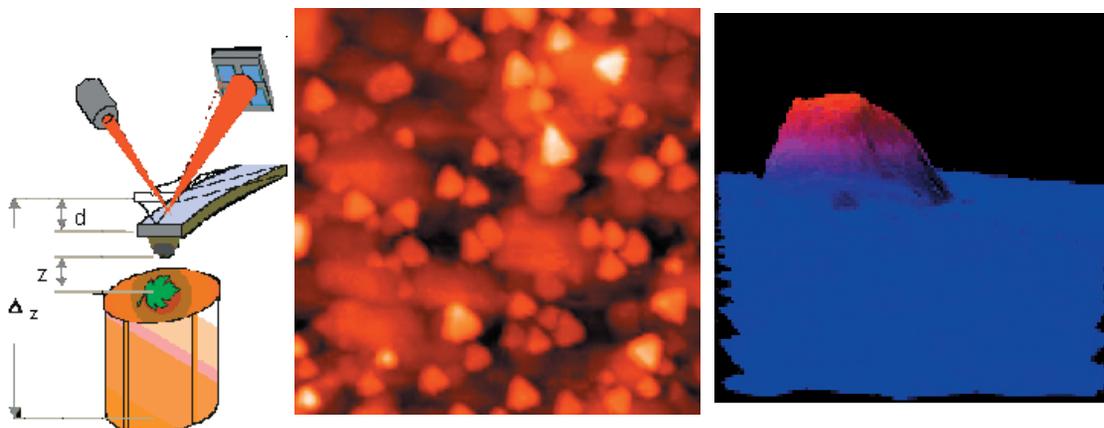


Fig. 9.- Esquema del funcionamiento de un AFM y dos imágenes de partículas de Au

## Conclusiones

En esta reseña de la historia de la microscopía se aprecia que desde el siglo XVII grandes físicos, han contribuido de manera importante en el desarrollo de diferentes técnicas de microscopía. Hoy en día, varias de estas técnicas han alcanzado resoluciones atómicas; es decir, del orden de angstroms ( $10^{-10}$  m), permitiendo conocer más sobre los seres vivos; y materiales en general, a tal grado que el manejo de células y genes en los seres vivos y la manipulación de los átomos de los materiales son actualmente actividades que han revolucionado la ciencia, creando nuevos campos de desarrollo como la biotecnología y nanotecnología, en los que el ser humano ha apostado billones de dólares y que son considerados pilares en el futuro de la humanidad.

Desde el punto de vista de la física, el desarrollo de las técnicas de TEM, AFM y STM ha hecho realidad el paso de nuestro mundo clásico al mundo cuántico. Sin lugar a duda que la vida del hombre no sería lo que es hoy sin estas novedosas técnicas.

## Agradecimientos

Se agradece a la M. en C. Yuriria Silva Velásquez sus valiosos comentarios a este trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

Díaz G., Arenas-Alatorre J. (2003), Capítulo 17, Vol. 2b del libro: Electroquímica y Electrocatalisis, Editado por Nicolas Alonso Vante: "Microscopía Electrónica de Barrido y Técnicas Analíticas Asociadas para la Caracterización de Electrocatalizadores y Superficies de Electrodo". Editorial e-libro.net., Buenos Aires Argentina.

Gundlach Heinz, Frits Zernike and phase contrast microscopy: Celebrating 50 years of live cell analysis. *Microscopy and Analysis* **63**(2003)9-11

Freundlich M.M, The history of the development of the first High Resolution Electron Microscope, *Microscopy Society of America Bulletin* **24**(1994)405-415.

Horton M., Lehenkari and Charras Guillaume, Combined atomic force and confocal microscopy for biological processes. *Microscopy and Analysis* **63**(2003)13-15.

Lanfranconi, M, (2001), Historia de la Microscopía

[http://www.mdp.edu.ar/exactas/biologia/grupos/version%201\\_1/Practicos/archivos/049\\_055\\_LECTURA\\_Microscopia.pdf](http://www.mdp.edu.ar/exactas/biologia/grupos/version%201_1/Practicos/archivos/049_055_LECTURA_Microscopia.pdf)

Locquin, M y Langeron, M. 1985. Manual de Microscopia. Editorial Labor. Barcelona, España. Pg. 42-45.

Soto Eguibar E., La Microscopía Confocal, *Elementos* **17**(1993)35-39

10 -xx

Wilson T., Juskaitis R. and Tan J.B., Differential imaging in confocal microscopy. *Microscopy* **175**(1994) 1-20.

Wolf B. and Paufler P., Mechanical properties of quasicrystals studied by scanning probe Microscopy **39**(1999)13-16.

Yacamán J.M., Reyes Gasga J. (1995). "Microscopía Electrónica, una Visión del Microcosmos. Fondo de Cultura Económica, México.

<http://www.cyto.purdue.edu/mirrors/oviedo/clsm/presclsm.htm>

<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Runway/3402/efecto.htm>