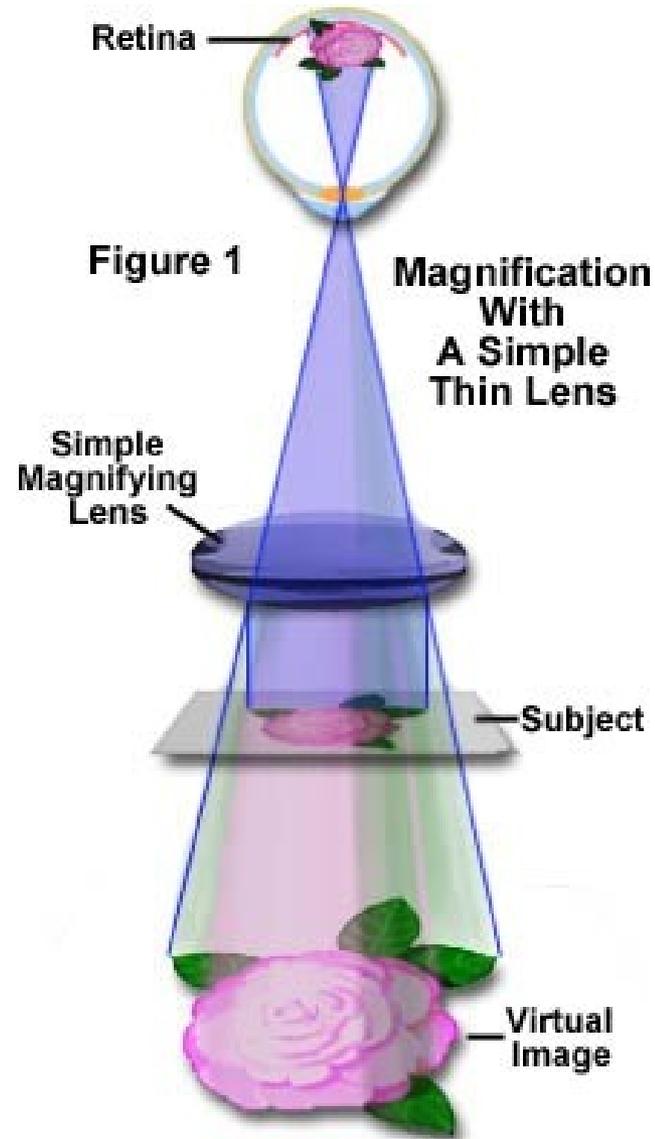
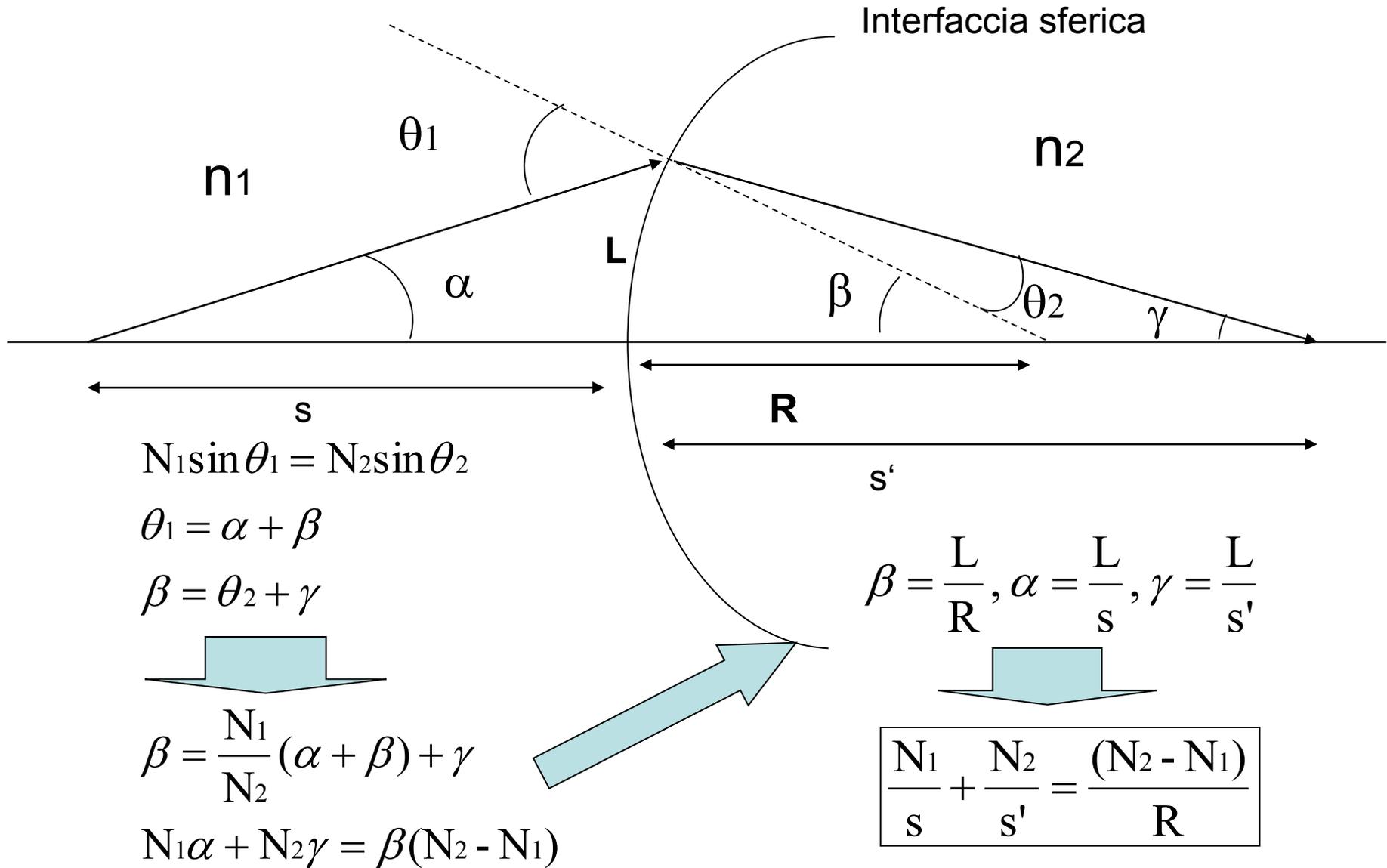


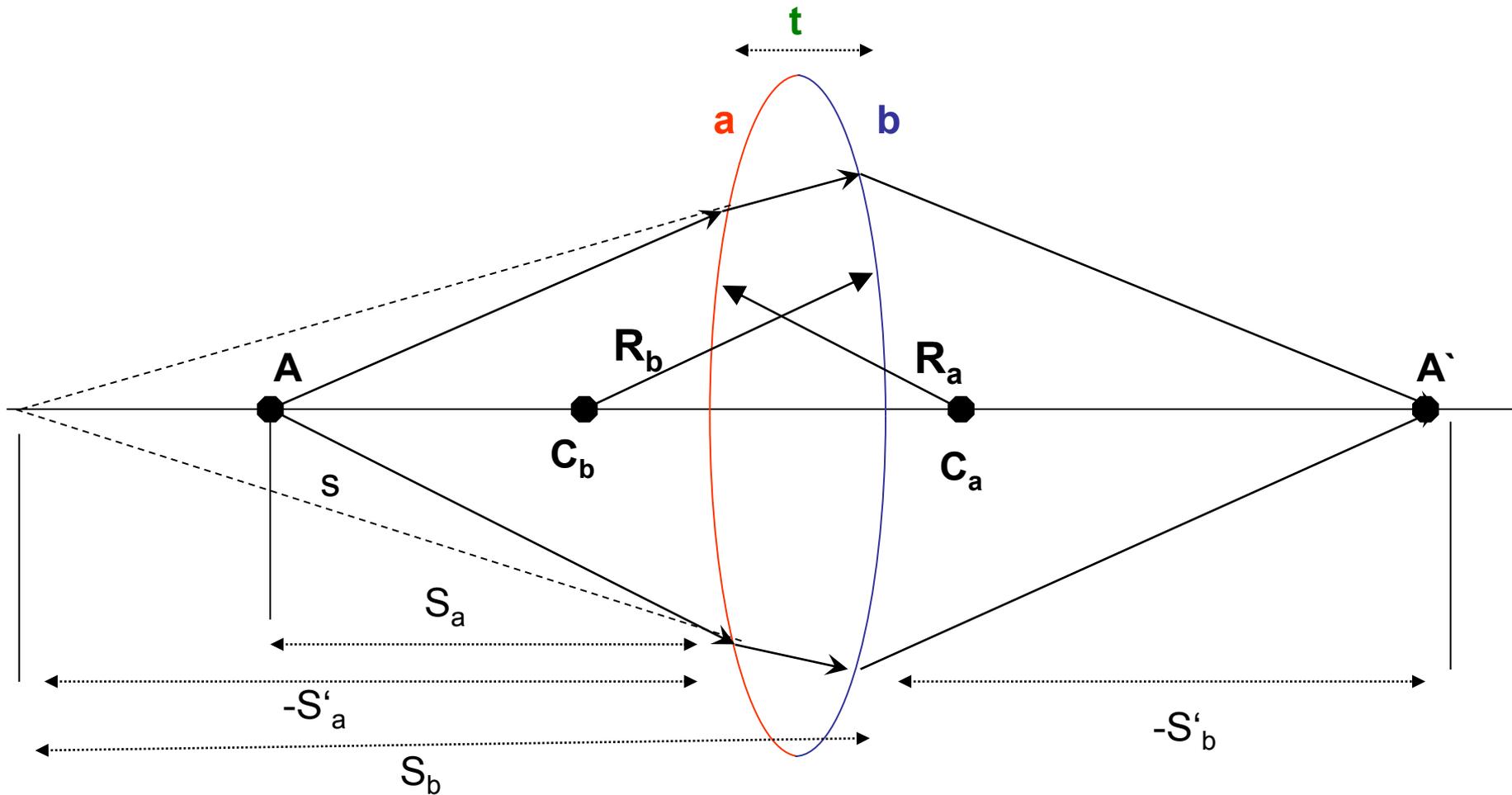
Microscopia



Lenti e ingrandimento



Lenti e ingrandimento



$$\frac{n_1}{S_a} + \frac{n_2}{S'_a} = \frac{(n_2 - n_1)}{R_a}$$

$$\frac{n_1}{S'_b} + \frac{n_2}{S_b} = \frac{(n_2 - n_1)}{-R_b}$$

Lenti e ingrandimento

se t piccolo $S_b = -S'_a$

$$\frac{n_2}{S_b} + \frac{n_1}{S'_b} = \frac{n_2}{-S'_a} + \frac{n_1}{S'_b} = \frac{(n_1 - n_2)}{R_b} = \frac{(n_2 - n_1)}{-R_b}$$

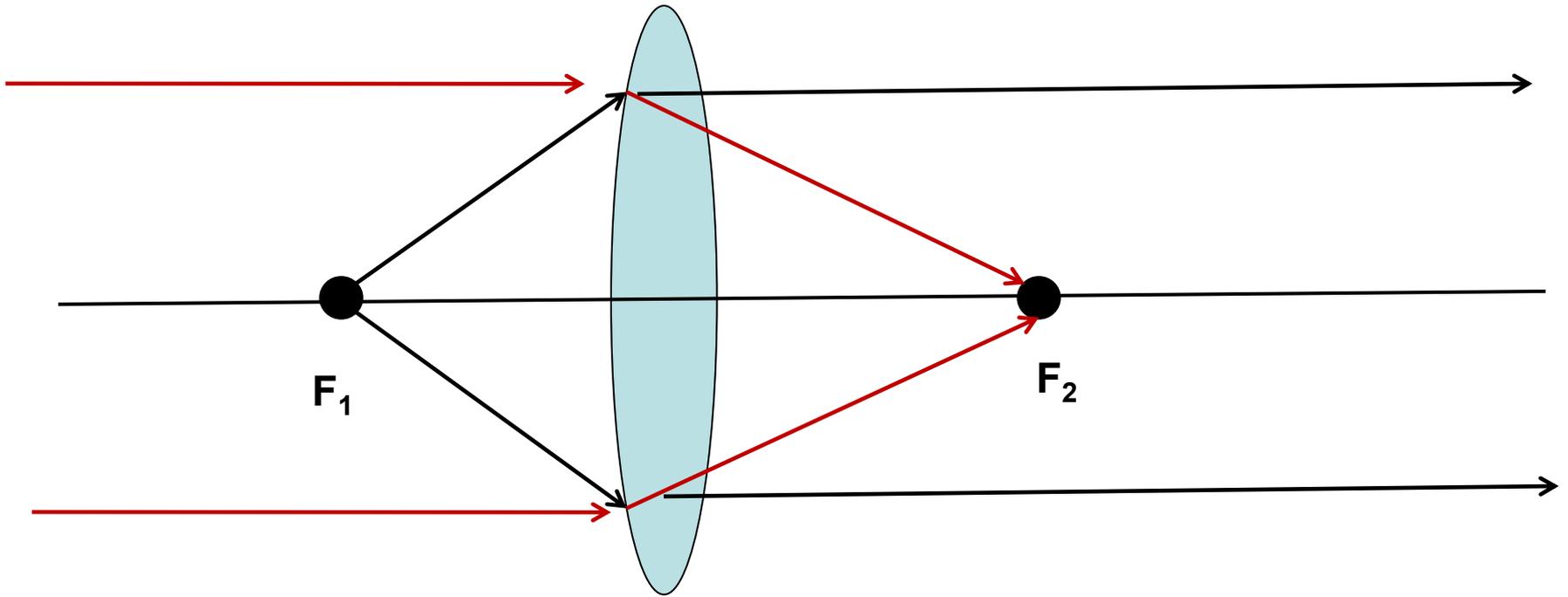
sommando questa equazione a quella precedente abbiamo :

$$\frac{n_1}{S_a} + \frac{n_1}{S'_b} = (n_2 - n_1) \left(\frac{1}{R_a} - \frac{1}{R_b} \right)$$

$$\frac{1}{S_a} + \frac{1}{S'_b} = \frac{1}{f}$$

$$\frac{n_1}{f} = (n_2 - n_1) \left(\frac{1}{R_a} - \frac{1}{R_b} \right) \quad \text{equazione dei "costruttori di lenti"}$$

Fuoco di una lente

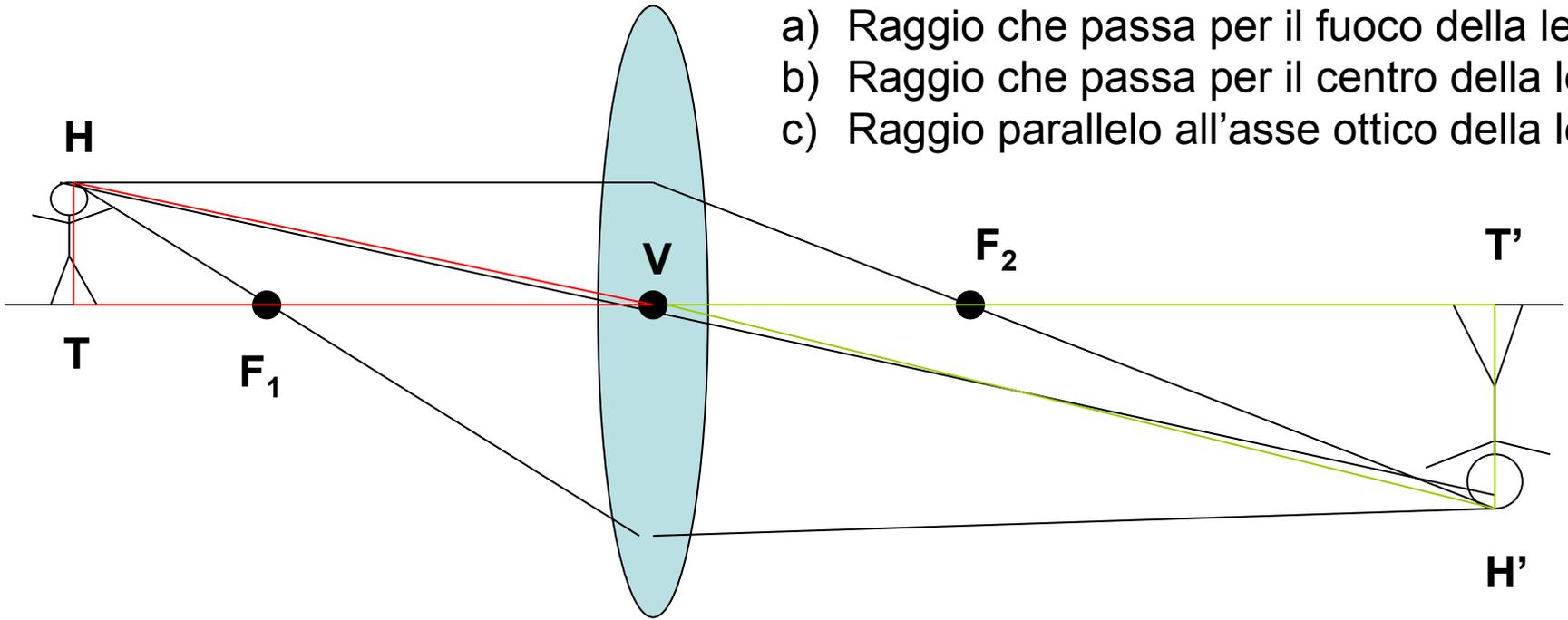


Fuoco primario: è la posizione in cui l'oggetto produce un'immagine all'infinito

Fuoco secondario: è il punto in cui convergono i raggi che incidono paralleli sulla lente.

Raggi principali:

- a) Raggio che passa per il fuoco della lente
- b) Raggio che passa per il centro della lente
- c) Raggio parallelo all'asse ottico della lente



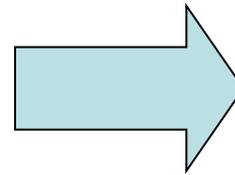
$$m = \frac{-H'T'}{HT}$$

per similitudine dei triangoli HTV e H'T'V

$HT \propto TV$ (distanza dell'oggetto dalla lente : s)

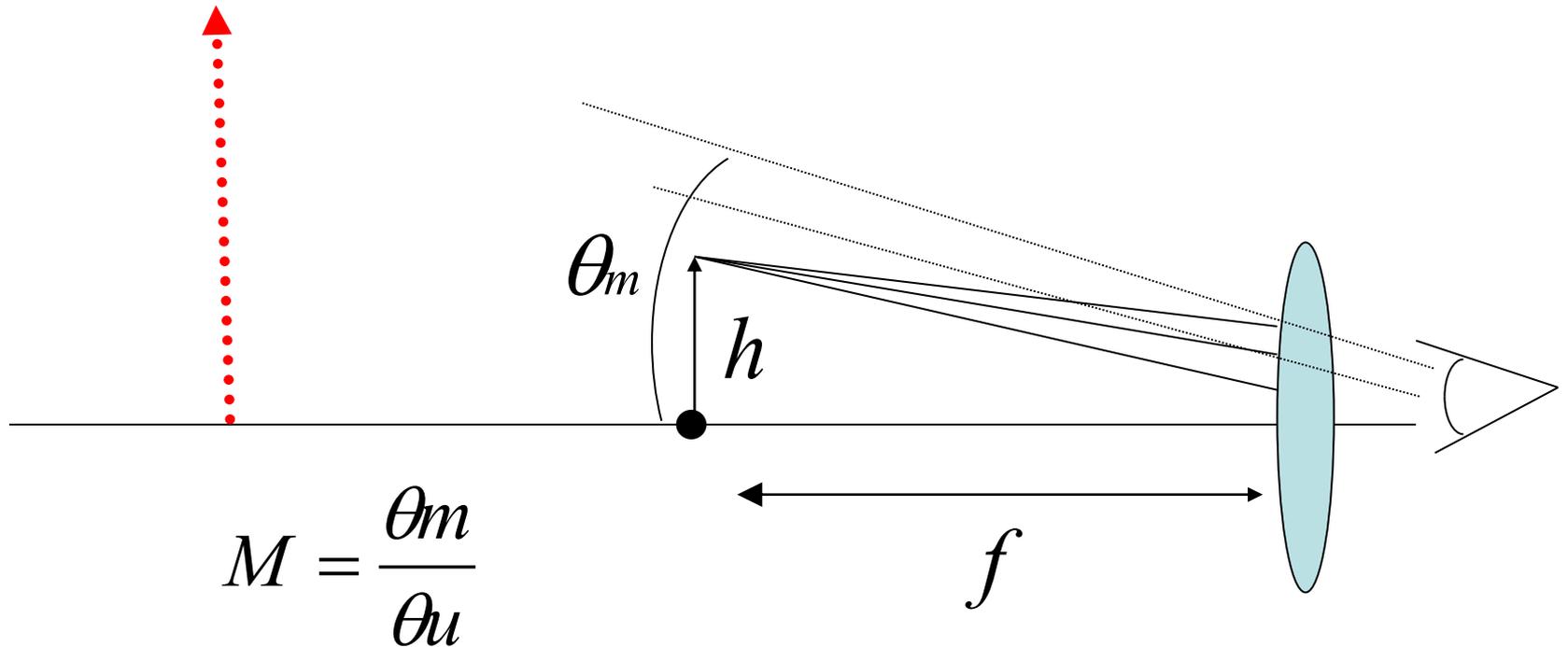
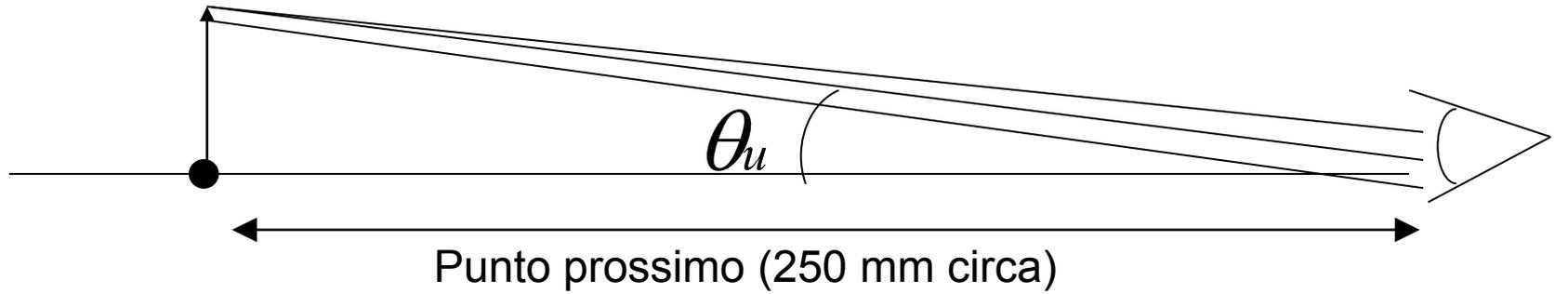
$-H'T' \propto T'V$ (distanza dell'immagine dalla lente : s')

$$\text{per cui } m = \frac{-H'T'}{HT} = \frac{T'V}{TV} = -\frac{s'}{s}$$



$$m = -\frac{s'}{s}$$

Il Microscopio semplice



Il Microscopio semplice

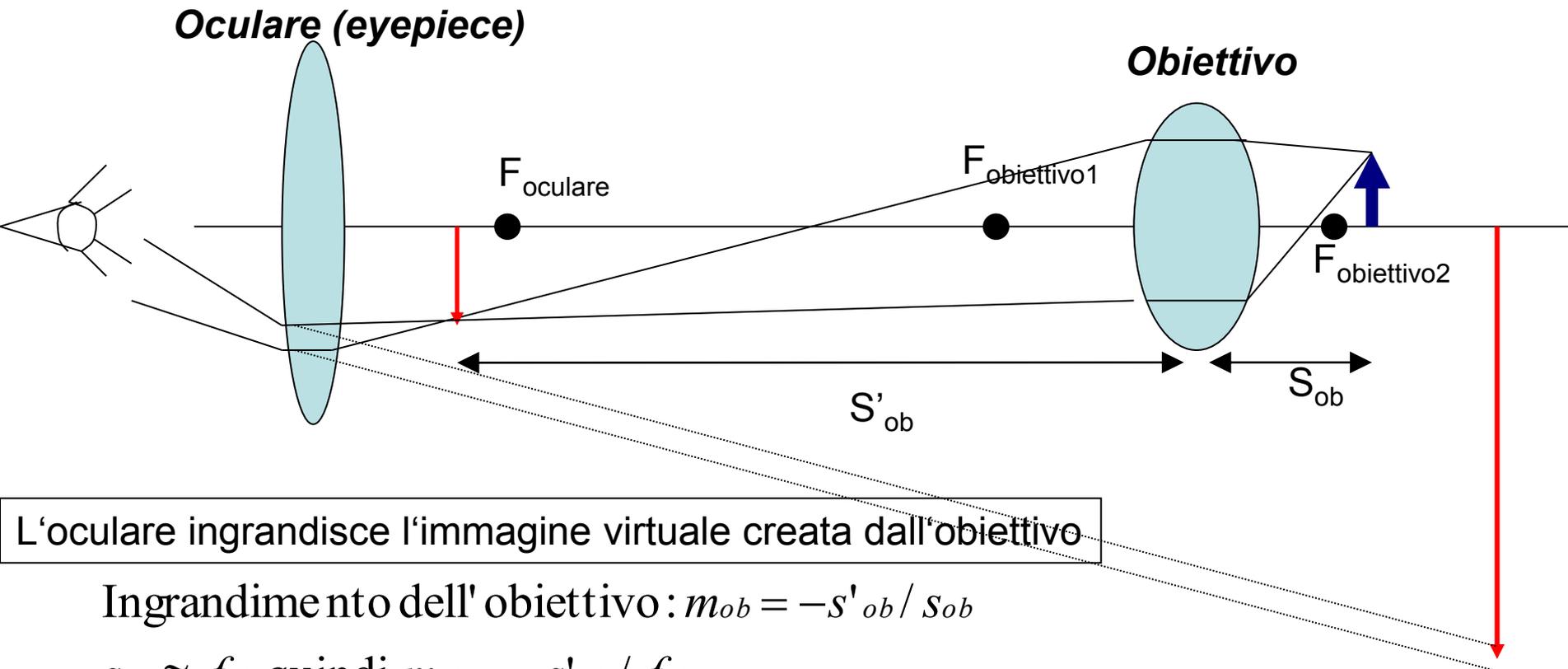
$$M = \frac{\theta_m}{\theta_u}$$

$$\theta_m = h / f$$

$$\theta_u = h / 250\text{mm}$$

$$M = 250\text{mm} / f$$

Il Microscopio composto



L'oculare ingrandisce l'immagine virtuale creata dall'obiettivo

Ingrandimento dell'obiettivo: $m_{ob} = -s'_{ob} / s_{ob}$

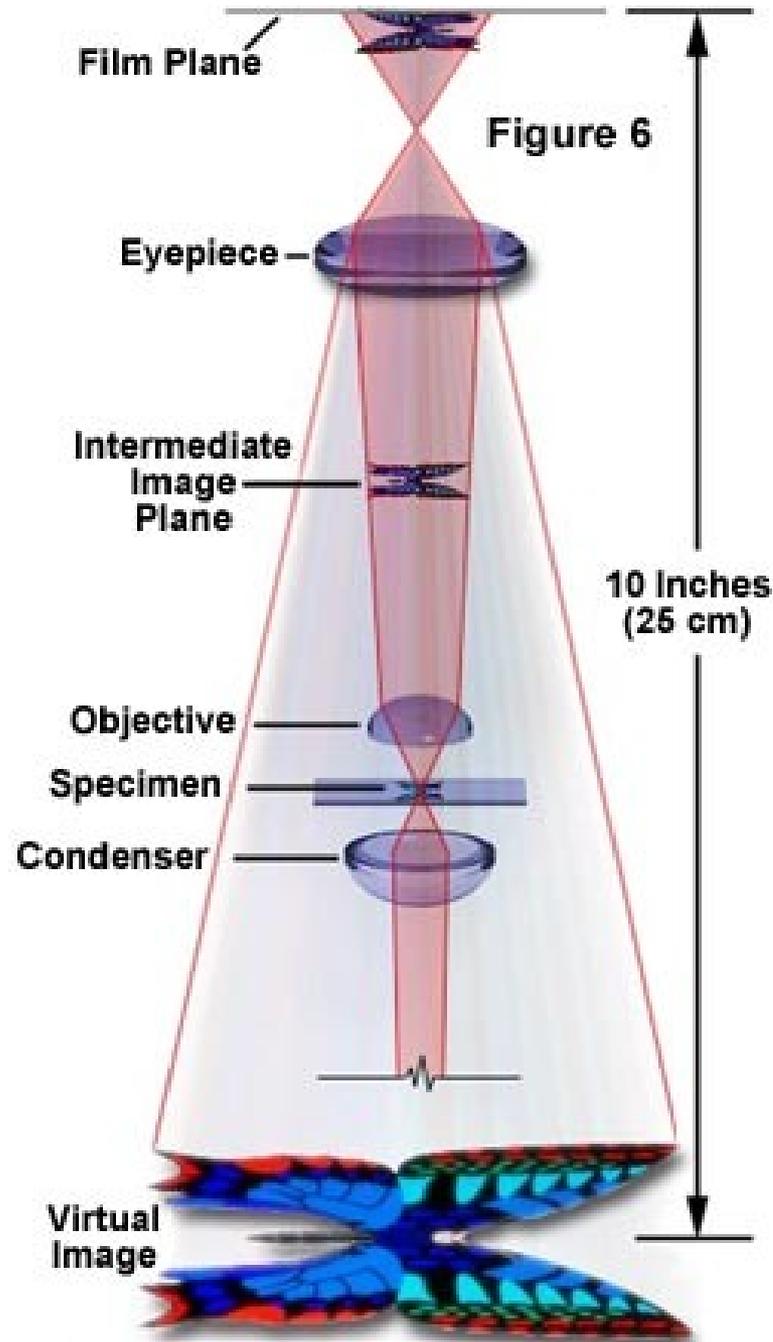
$s_{ob} \cong f_{ob}$ quindi $m_{ob} = -s'_{ob} / f_{ob}$

Ingrandimento dell'oculare: $M_{oc} = L / f_{oc} = 250\text{mm} / f_{oc}$

Ingrandimento complessivo:

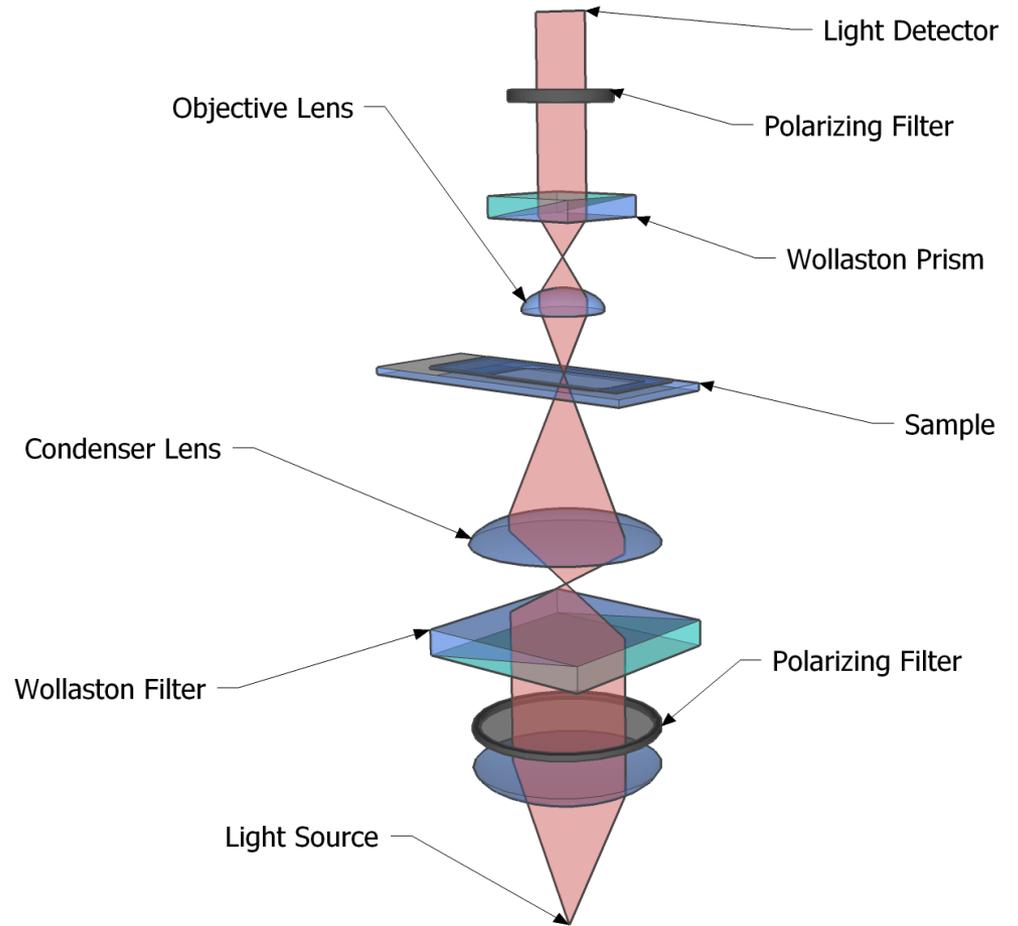
$$M = |M_{oc}m_{ob}| = \frac{250\text{mm} s'_{ob}}{f_{ob}f_{oc}}$$

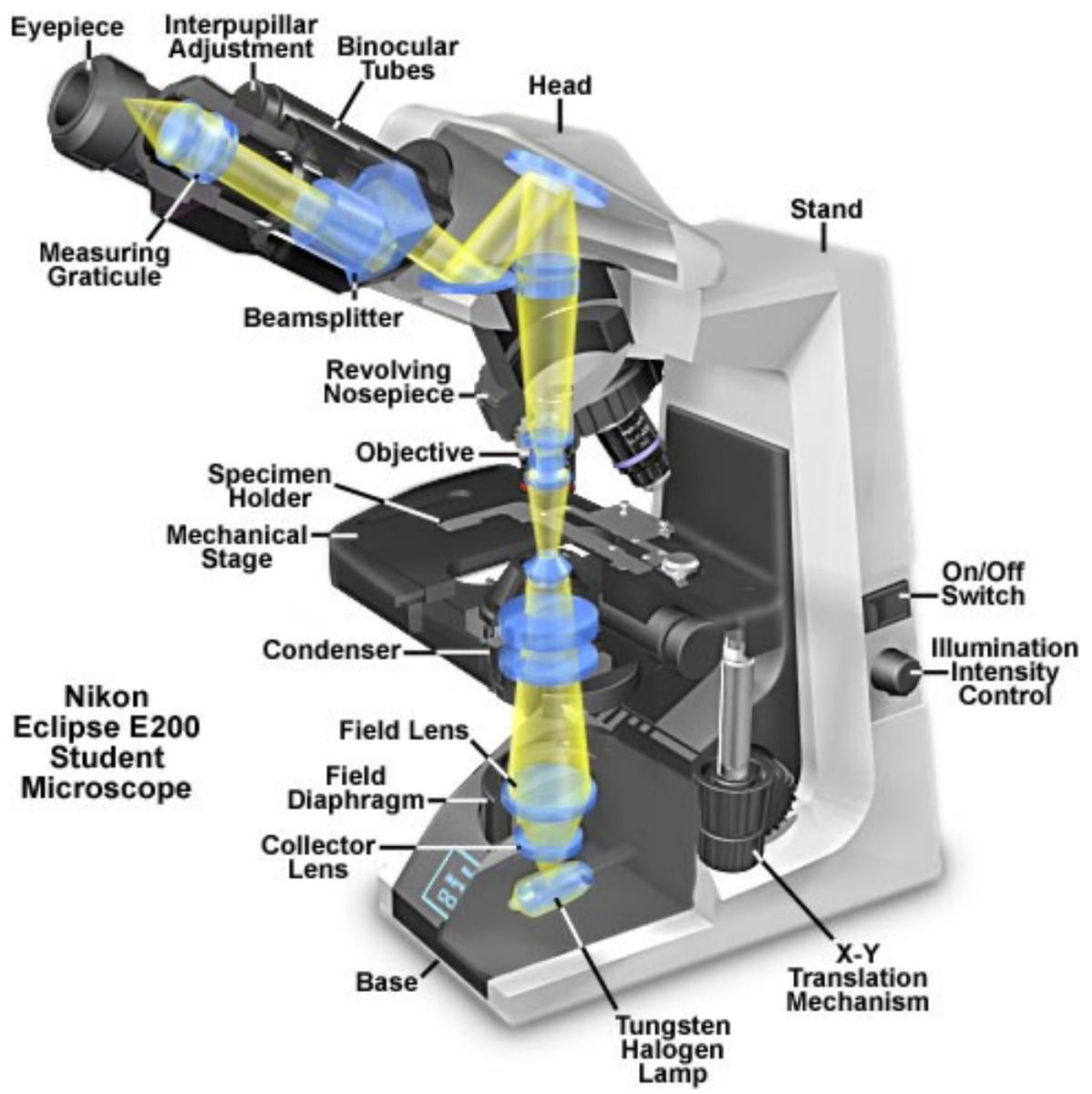
s'_{ob} detto anche lunghezza ottica del tubo T
(solitamente ≈ 160 mm)



Piano focale = piano perpendicolare all'asse ottico in cui le lenti focalizzano l'immagine.

Asse ottico = percorso lungo il quale la luce si propaga nel sistema





Limite di risoluzione di un microscopio

Intensity Distribution of Diffracted Light

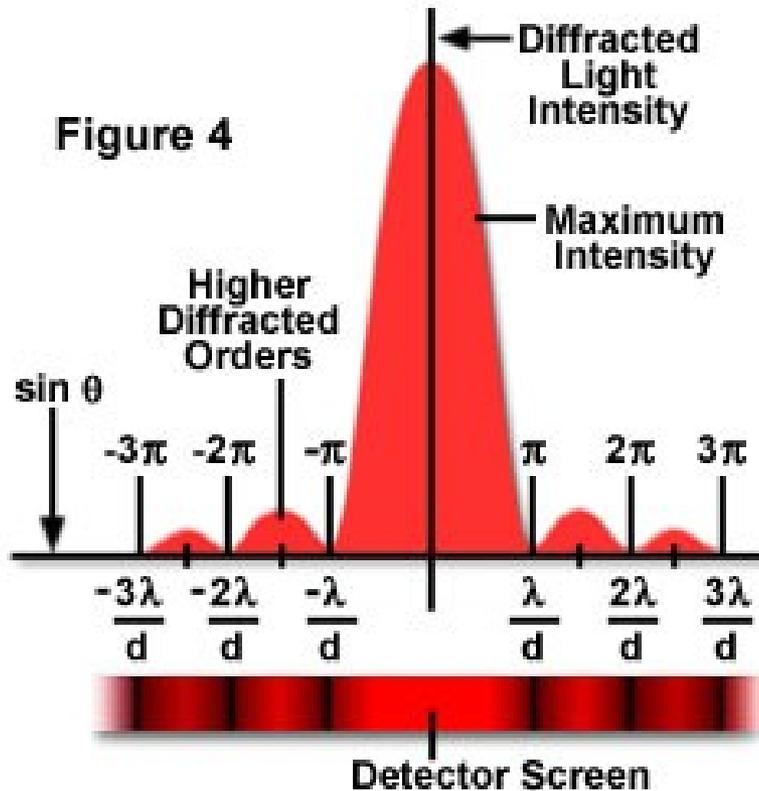
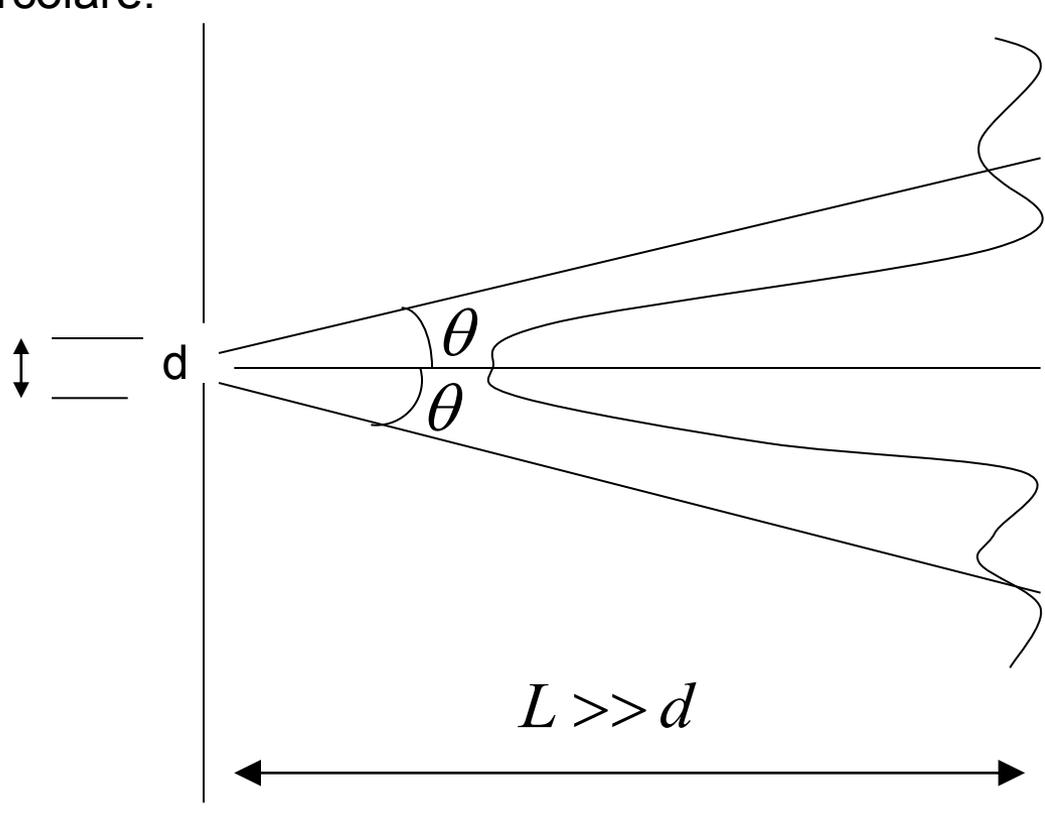


Figura di diffrazione di una fenditura

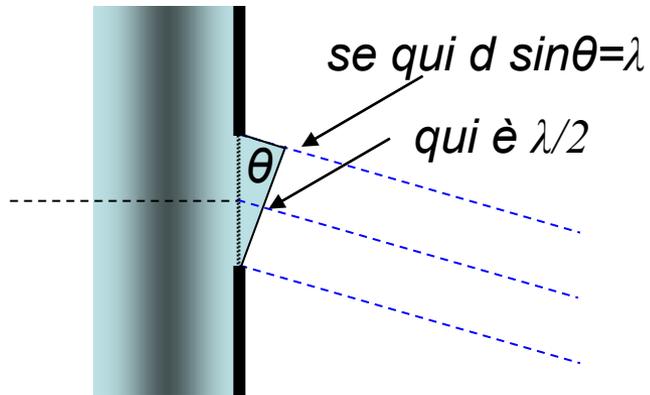
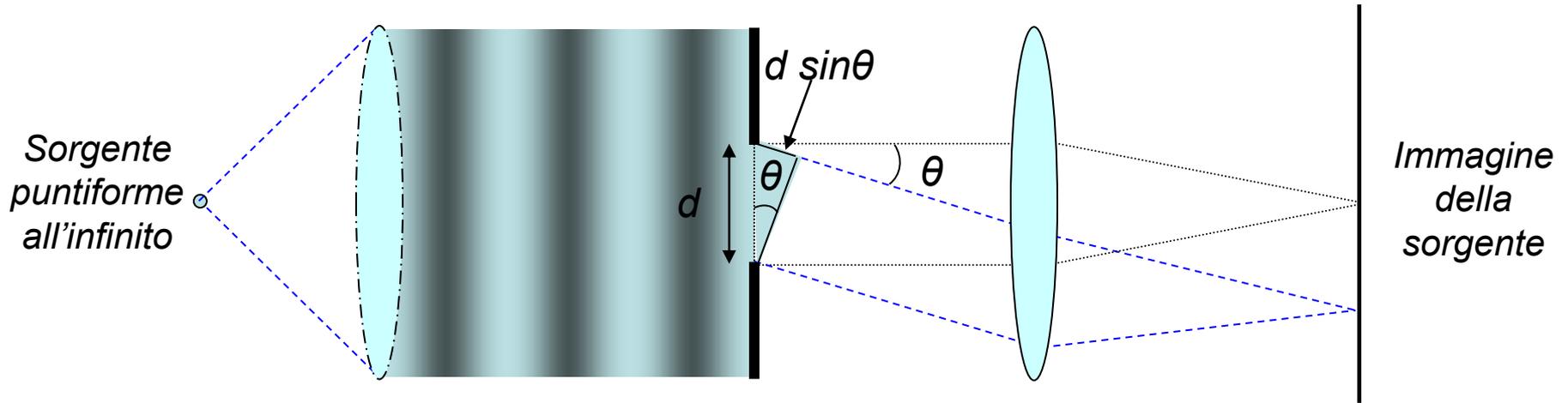
Limite di risoluzione di un microscopio

Apertura circolare:



Diffrazione da una fenditura

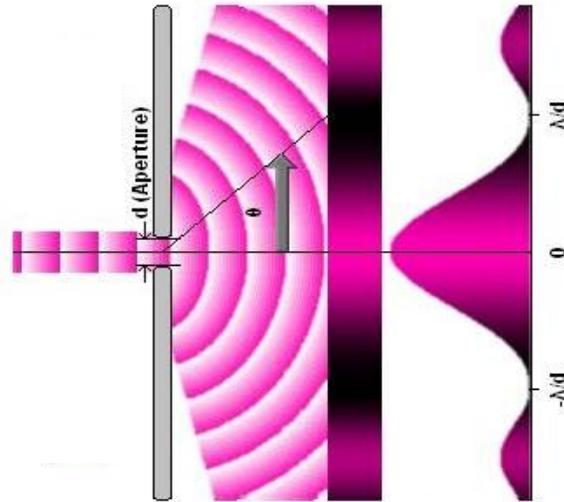
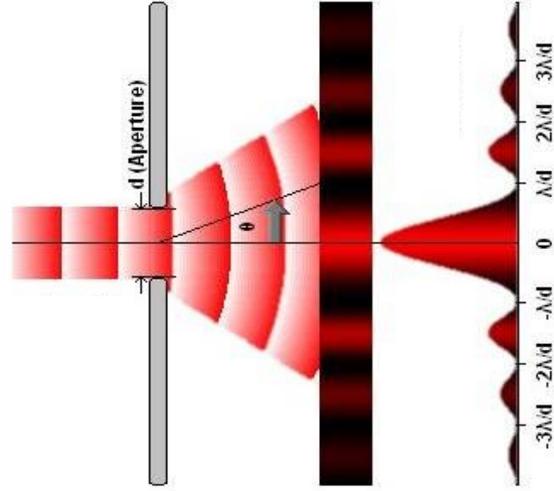
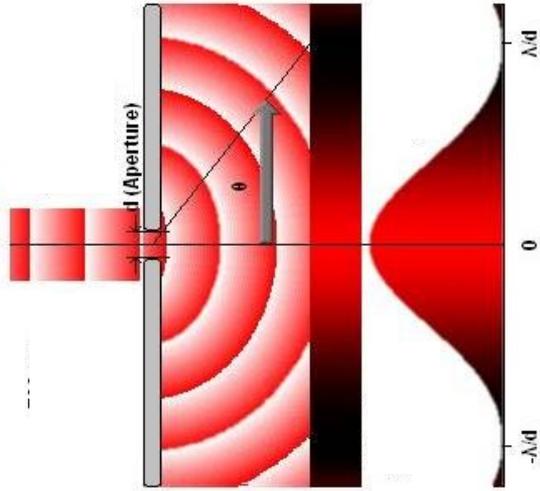
(piccola, cioè non sia $d \gg \lambda$)



Interferenza distruttiva
Primo minimo a $\sin \theta_1 = \lambda/d$

Diffrazione da una fenditura

(piccola, cioè non sia $d \gg \lambda$)

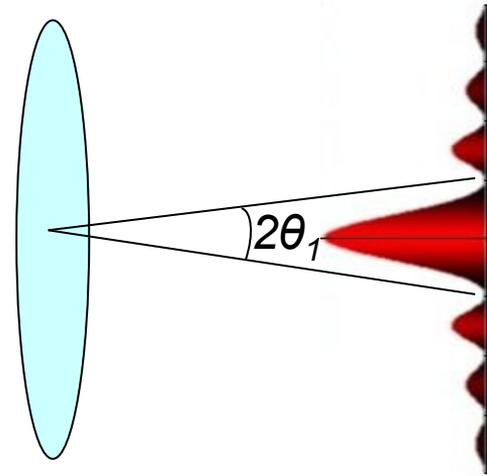


Se la fenditura è circolare



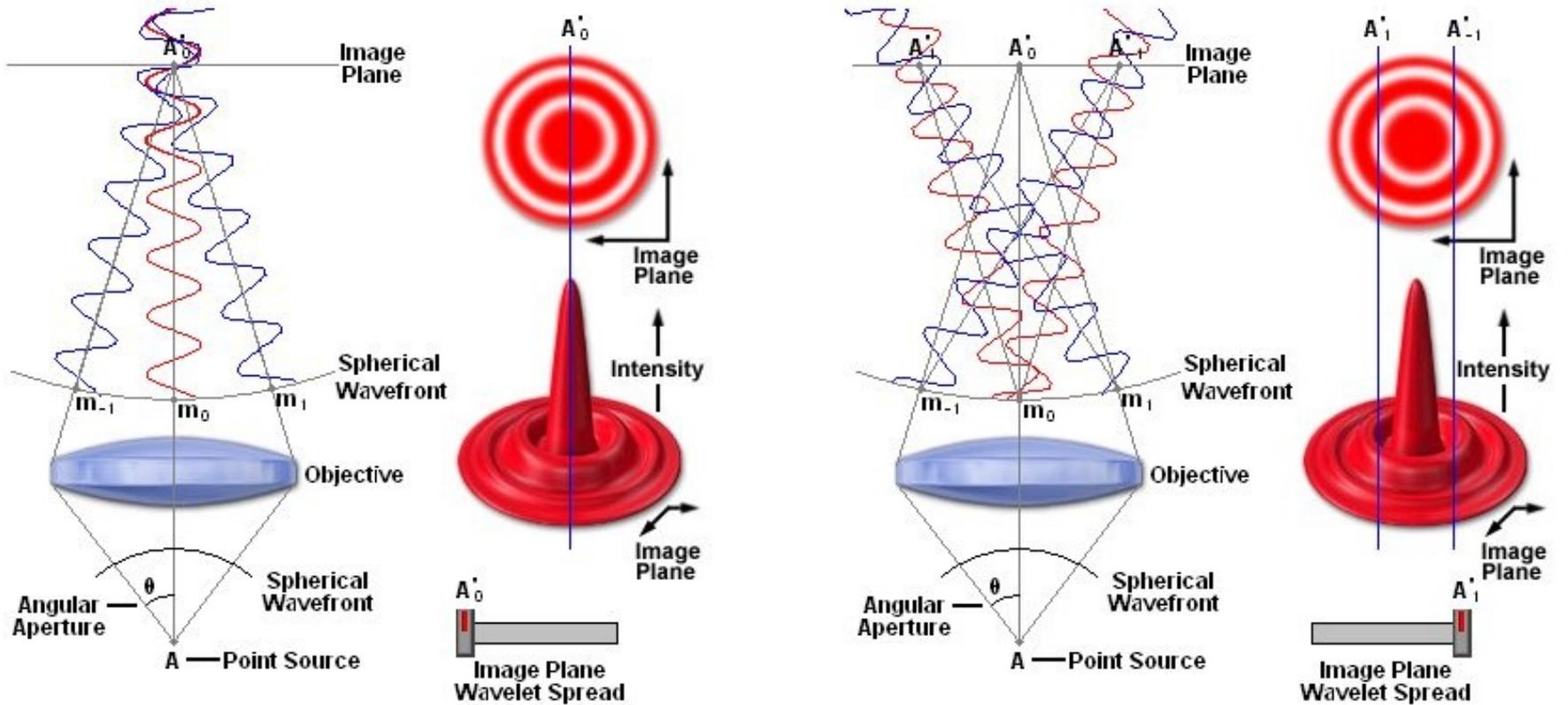
$$\sin \theta_1 = 1.22 \frac{\lambda}{d}$$

$2\theta_1$ rappresenta il
diametro angolare dell'immagine
di un punto luminoso all'infinito data da
un sistema ottico (esente da
aberrazioni) con diametro di apertura d



- Una lente di dimensione finita si comporta come un diaframma (non fa passare luce per angoli maggiori della sua dimensione)

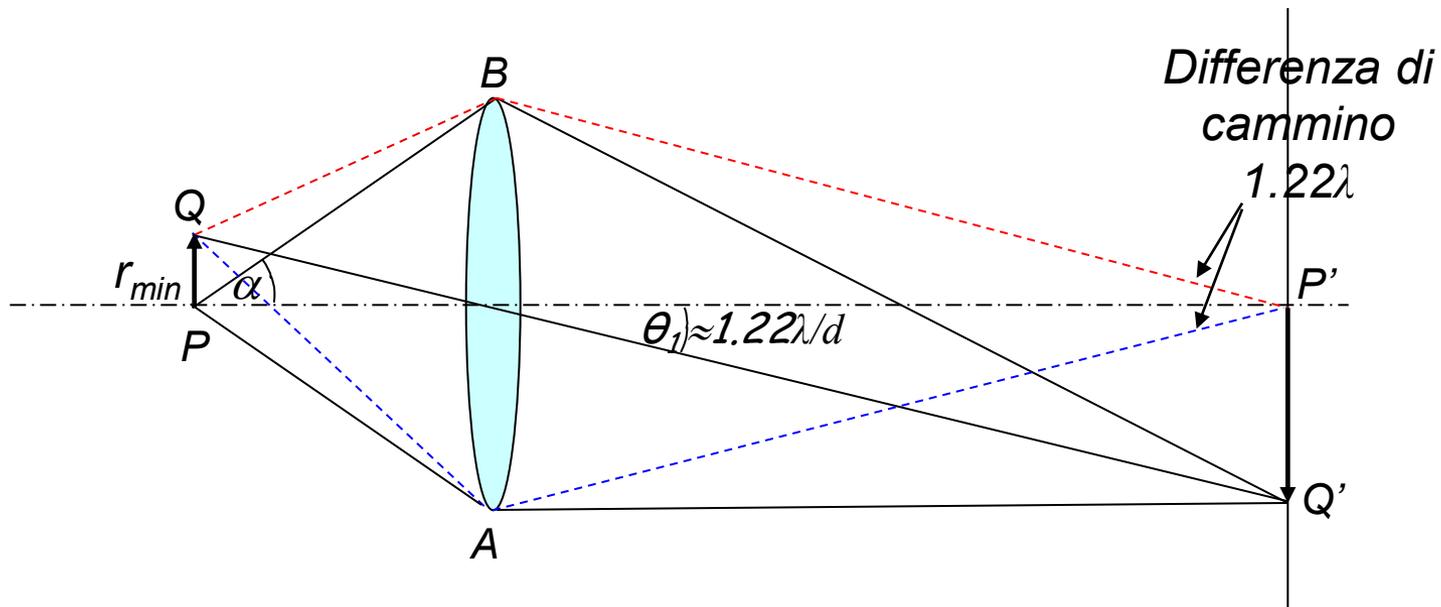
Disco di Airy



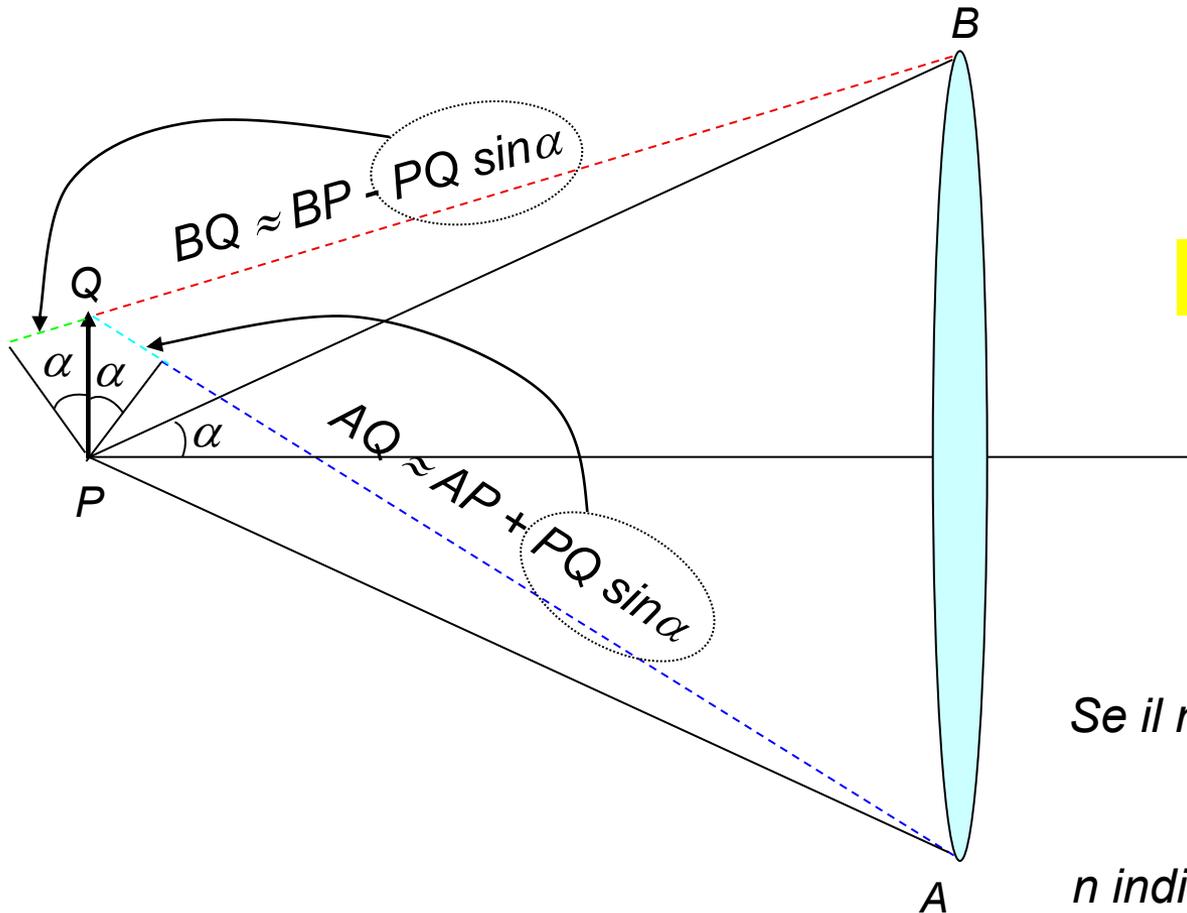
Vogliamo passare dal piano immagine a quello oggetto.

Se $P'Q'$ è la distanza minima tra i due punti immagine, quanto sono distanti P e Q ?

Qual è cioè la **distanza minima risolvibile** r_{min} .



Risoluzione: distanza minima risolvibile r_{\min}



$$AQ - BQ \sim 1.22 \lambda$$

$$2 PQ \sin \alpha \sim 1.22 \lambda$$

$$r_{\min} = PQ \sim 1.22 \lambda / 2 \sin \alpha$$

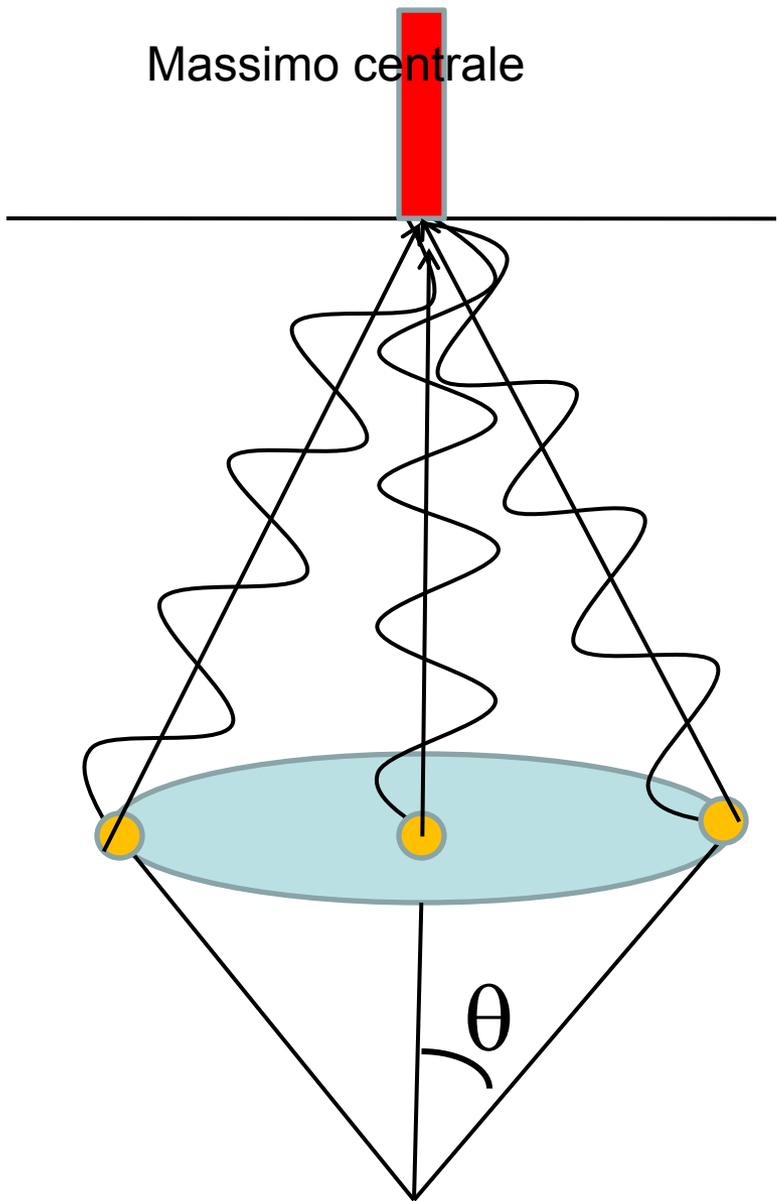
Se il mezzo in cui viaggiano i raggi
diverso da aria

$$\lambda \rightarrow \lambda/n$$

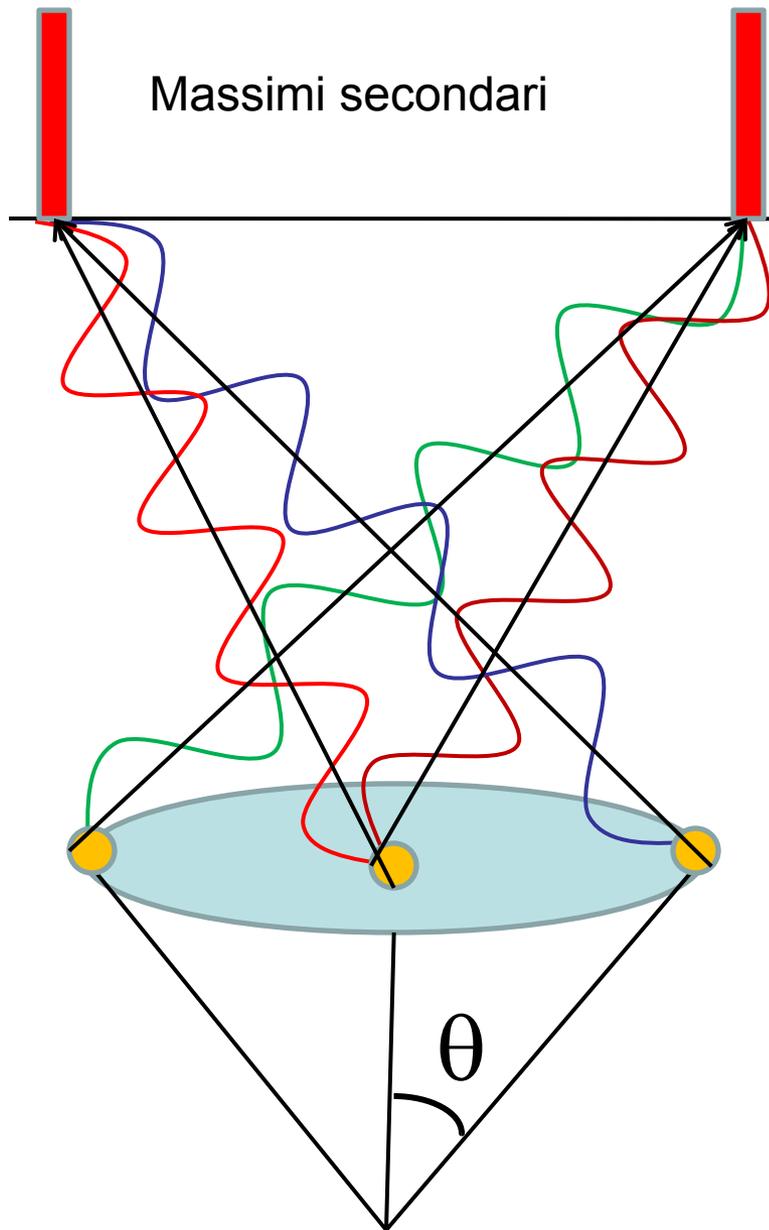
n indice di rifrazione del mezzo tra
l'oggetto e la lente

$$r_{\min} \approx 0.61 \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$$

Massimo centrale



Massimi secondari



Airy Disk Patterns and PSFs from Diffraction

$$\sin \theta_1 = 1.22 \frac{\lambda}{d}$$

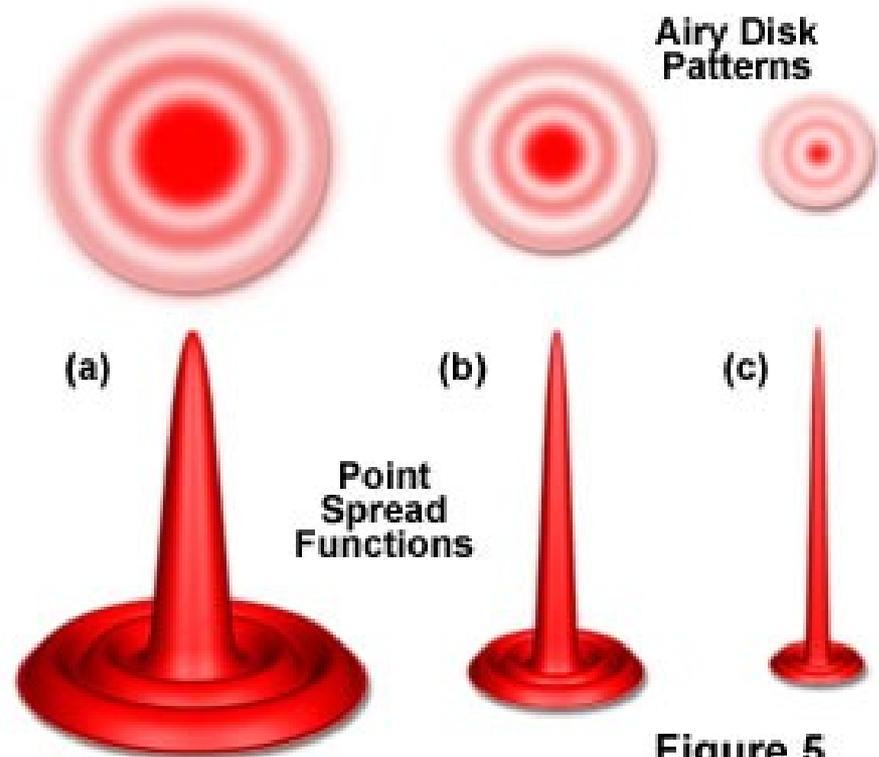
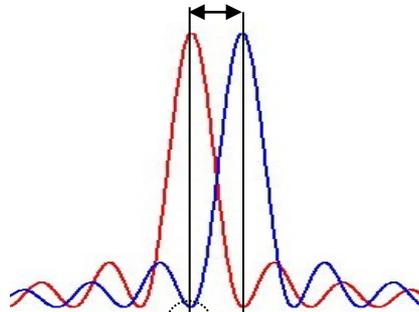


Figure 5

Potere risolutivo R

Il primo minimo della curva blu è esattamente sul massimo della curva rossa



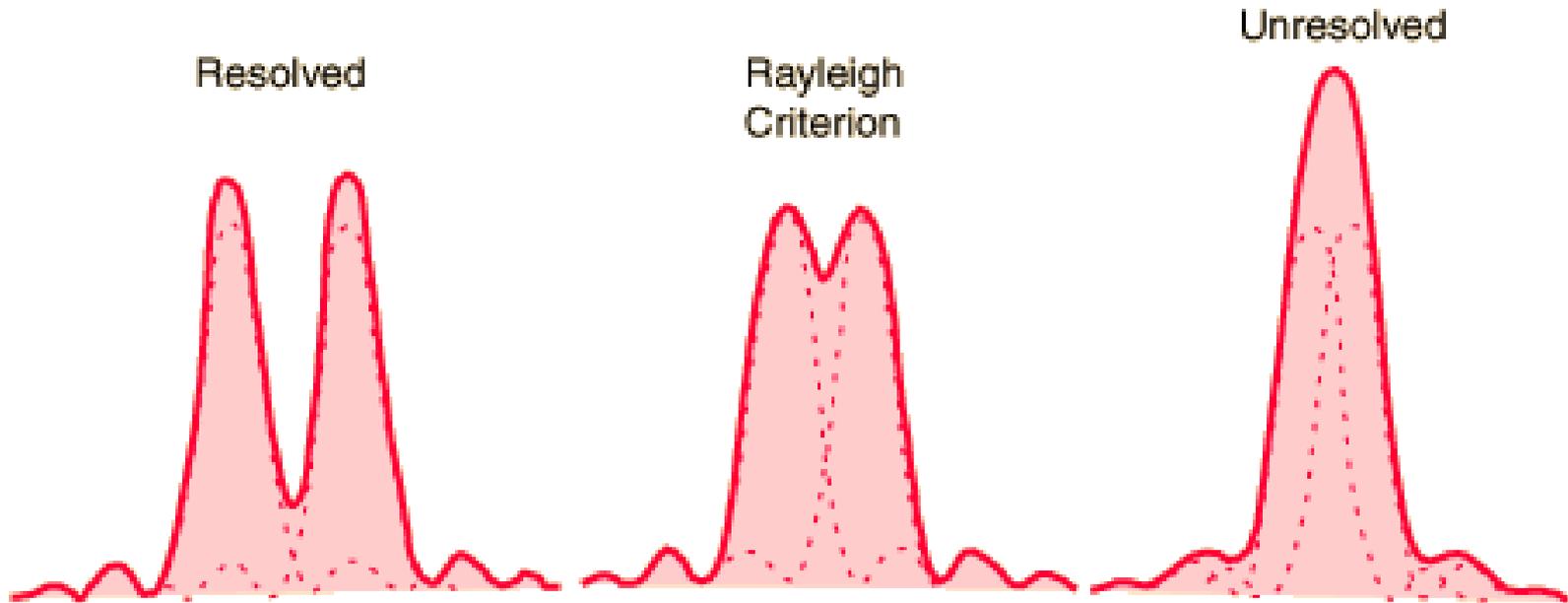
criterio di Rayleigh

la minima distanza tra i centri dei dischi di diffrazione di due punti affinché questi siano distinguibili è uguale al loro raggio

*Il **potere risolutivo** (o separatore) R è l'inverso dell'angolo minimo sotto il quale due punti immagine devono apparire all'obiettivo affinché essi siano distinguibili*

$$R \sim d/(1.22 \lambda)$$

Limite di risoluzione di un microscopio



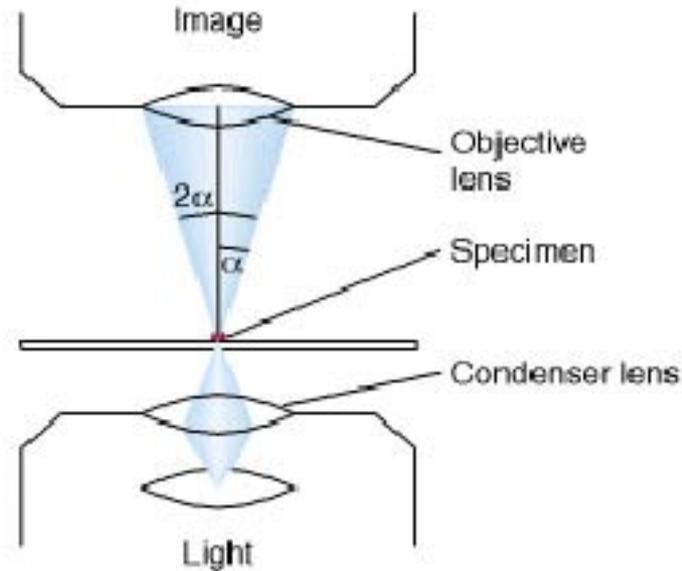
Criterio di Rayleigh:

due immagini sono al **limite della risoluzione (risolte)** se il centro del massimo centrale di una figura coincide con il primo anello scuro dell'altra.

Vengono quindi separate da una distanza d uguale al raggio del disco di Airy

Limite di risoluzione di un microscopio

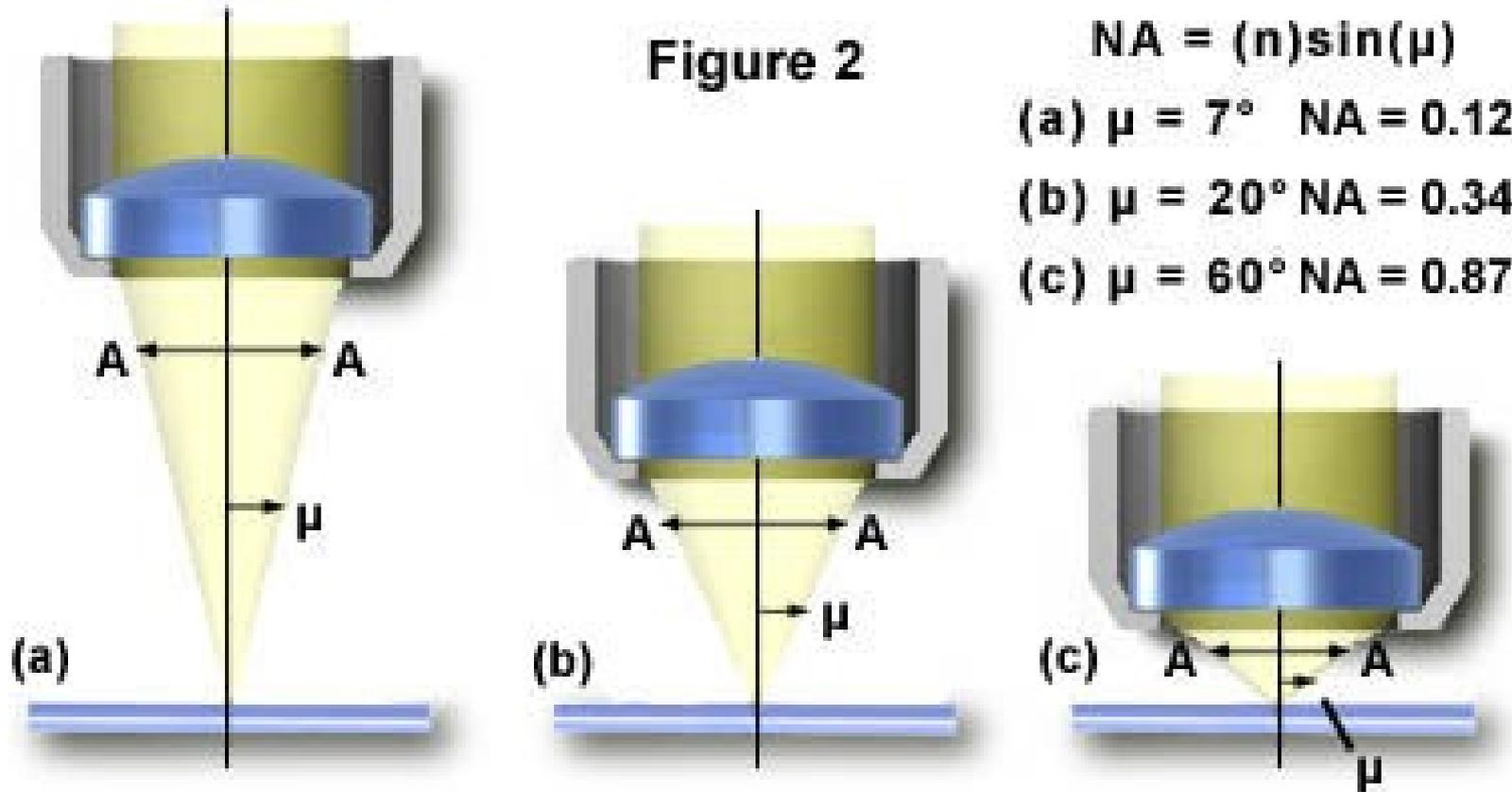
(b)



$$D = \frac{(0.61\lambda)}{N \sin \alpha}$$

$N \sin \alpha = \text{Apertura Numerica}$

Figure 2



Numerical Aperture and Airy Disc Size

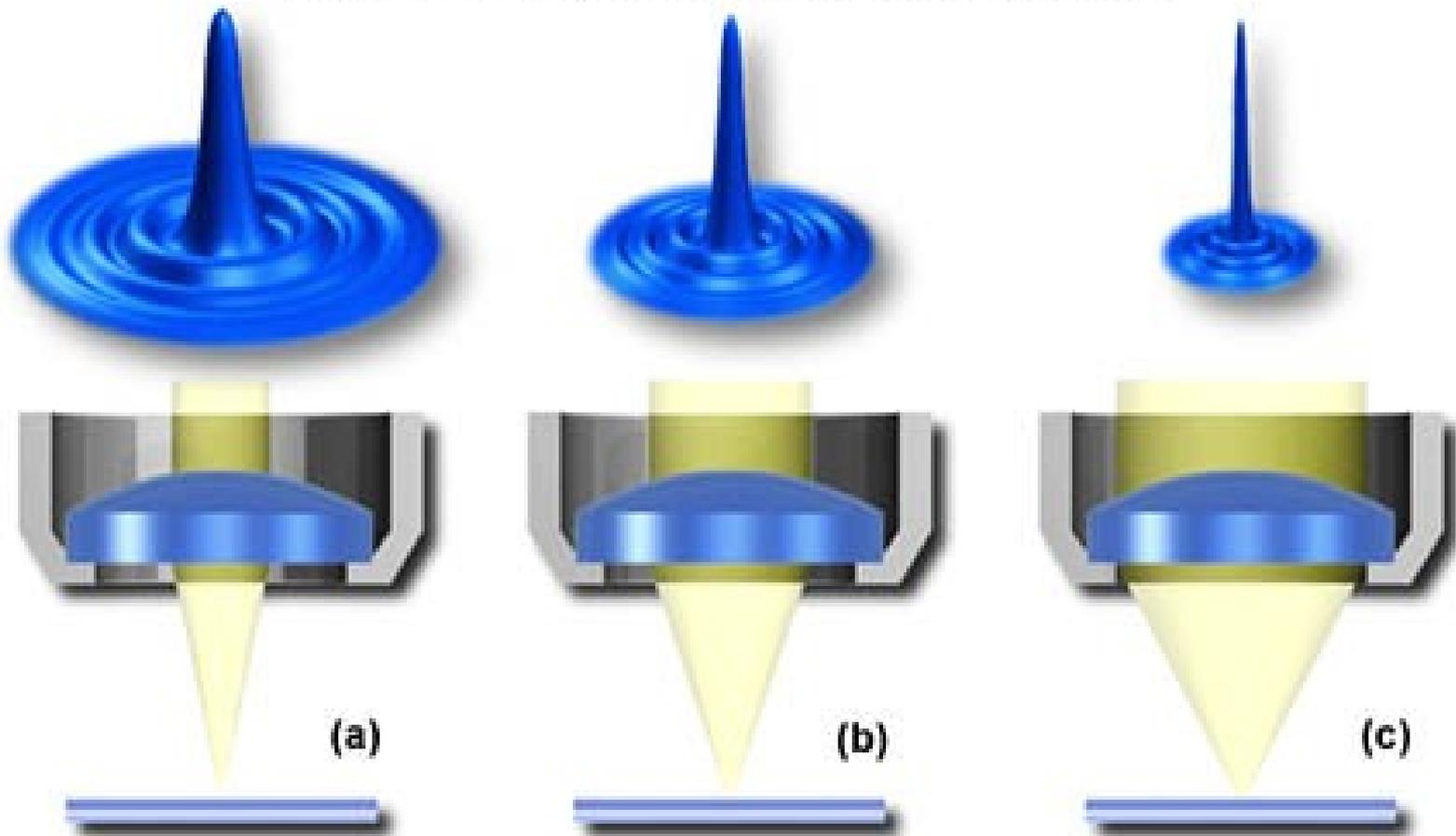
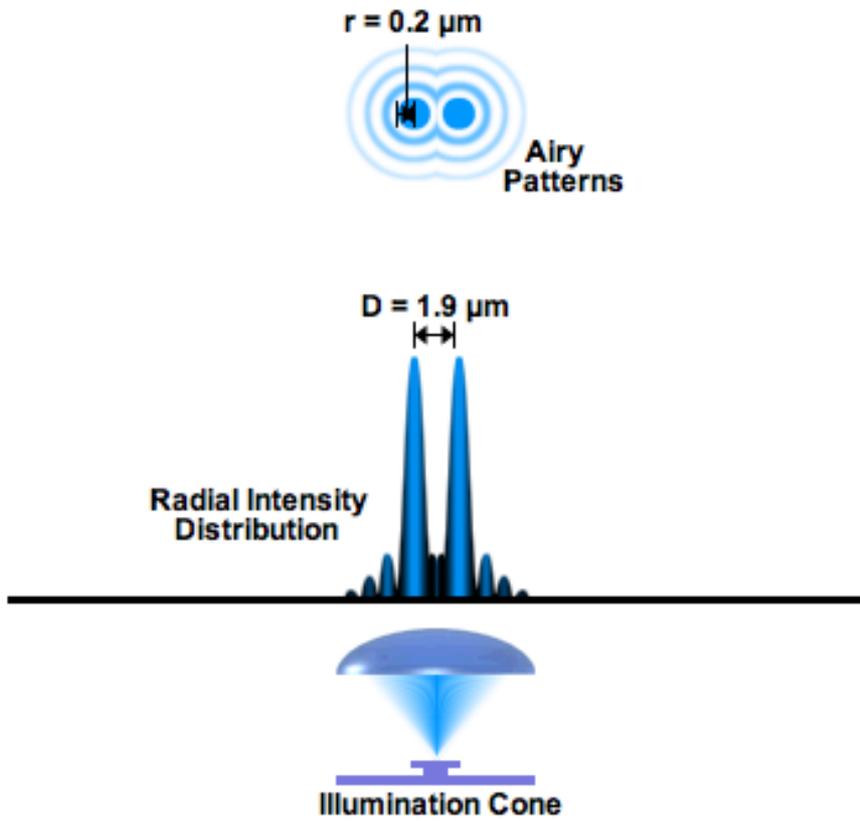
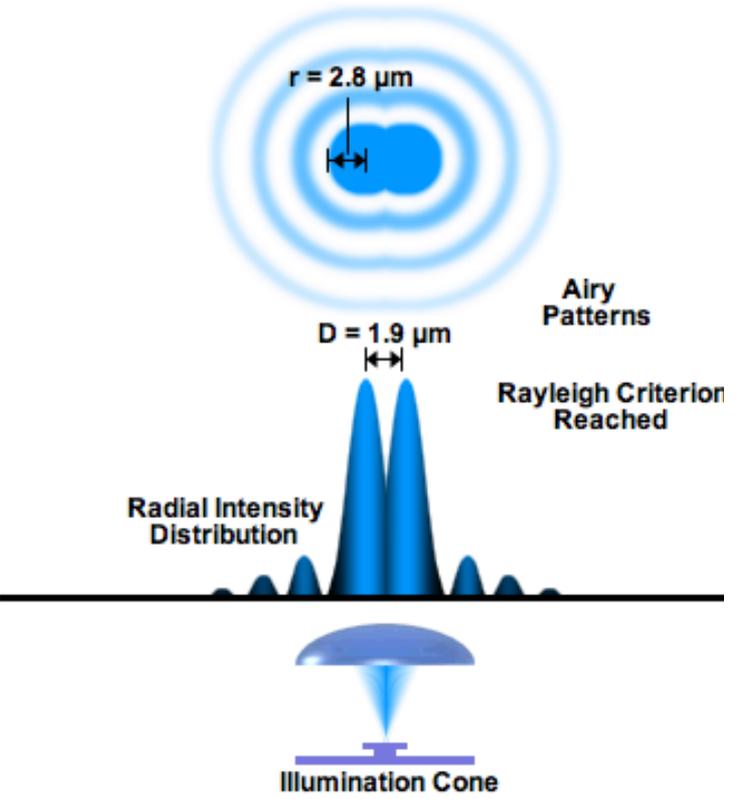


Figure 4

Dischi di Airy e Risoluzione Spaziale

- dischi di Airy più piccoli → maggiore risoluzione spaziale
 - **risoluzione** = capacità di distinguere 2 punti: vederli in maniera separata

Dischi di Airy e Risoluzione Spaziale

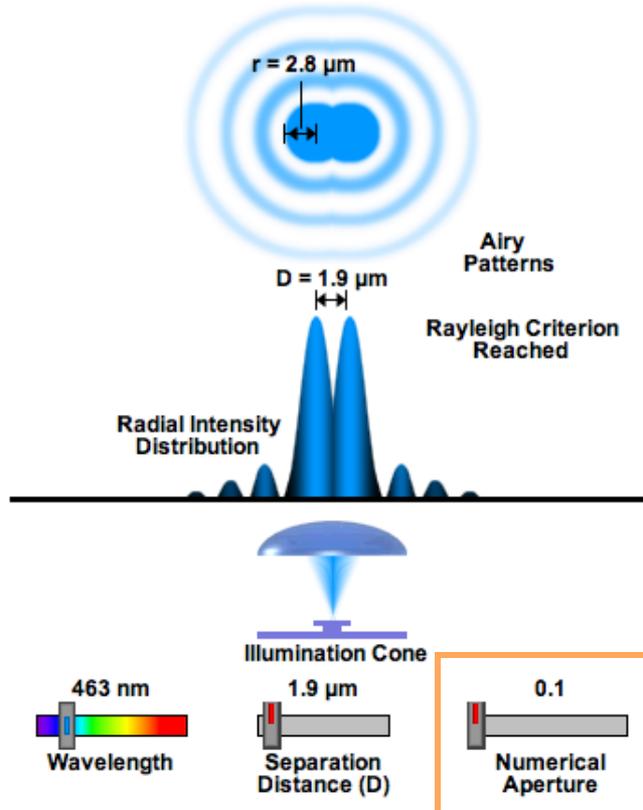


Dischi di Airy grandi → I due punti non sono risolti

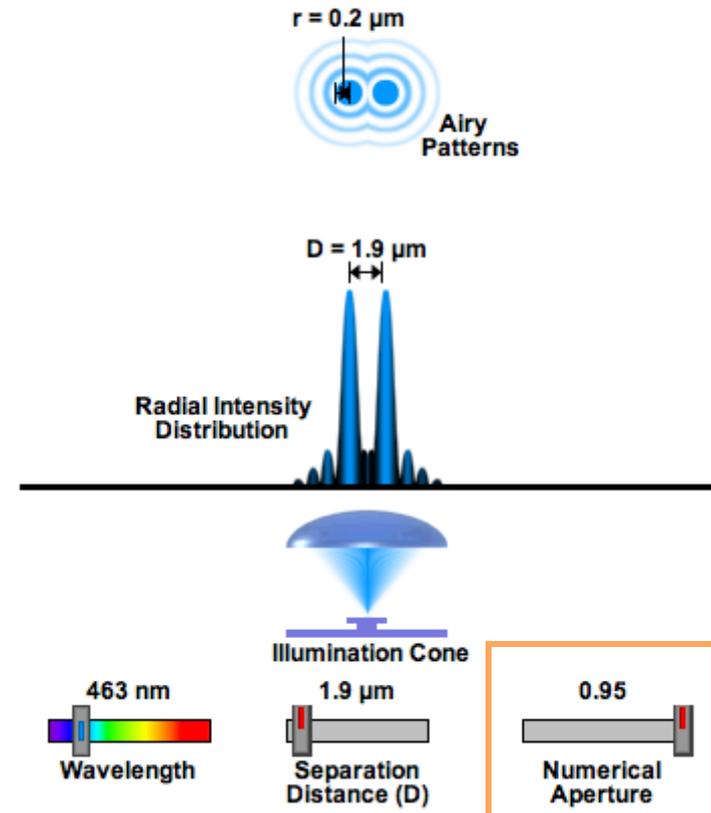
Dischi di Airy piccoli → I due punti sono risolti

Dischi di Airy e Risoluzione Spaziale

- Basso AN
- Airy più grande
- minore risoluzione

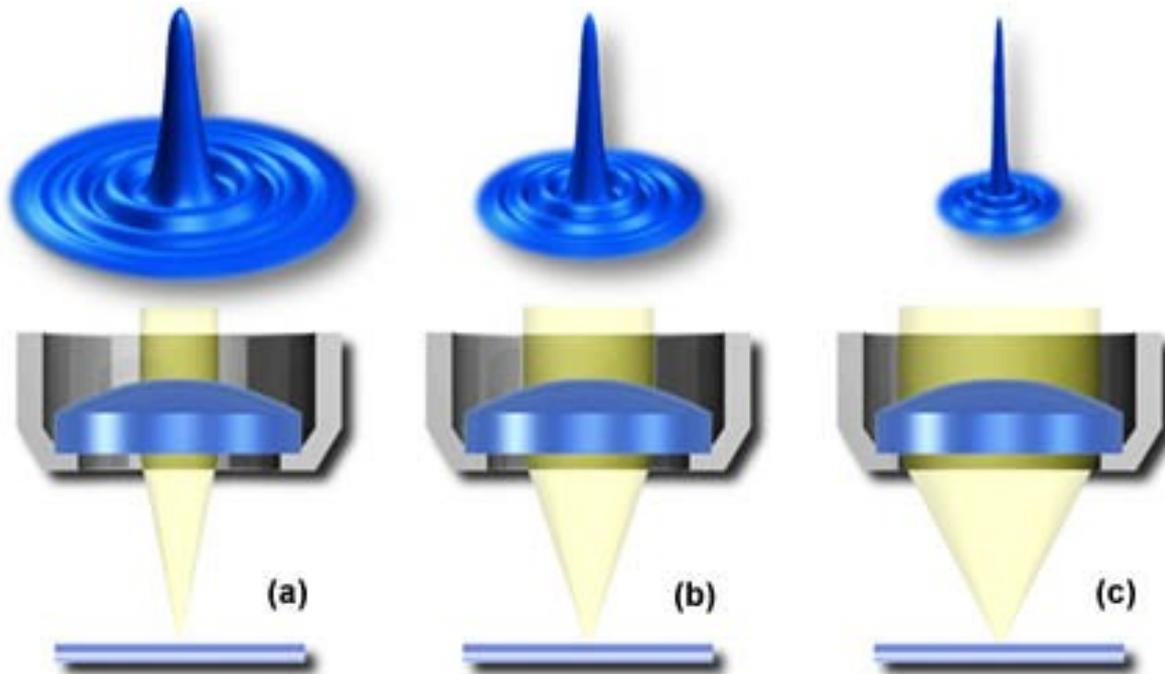


- Alto AN
- Airy più piccolo
- maggiore risoluzione



NA & Airy Disc Size

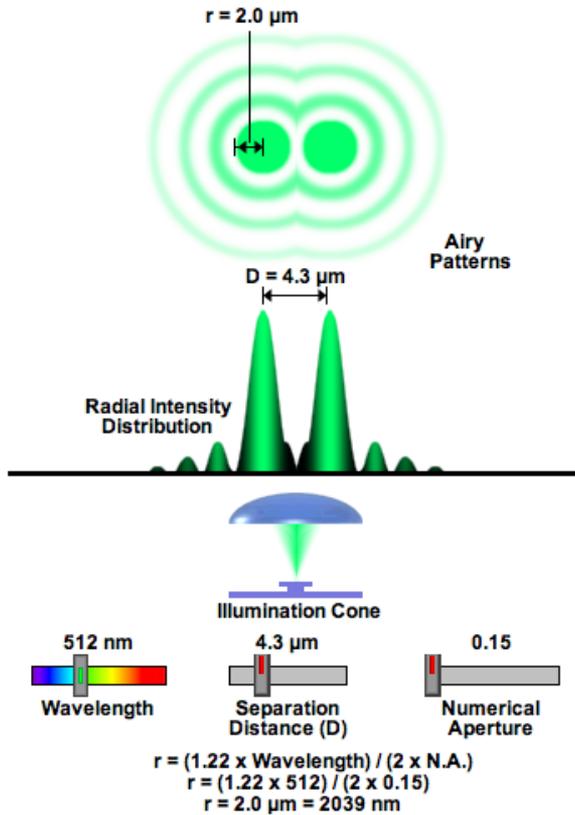
Airy più piccoli/
Migliore risoluzione



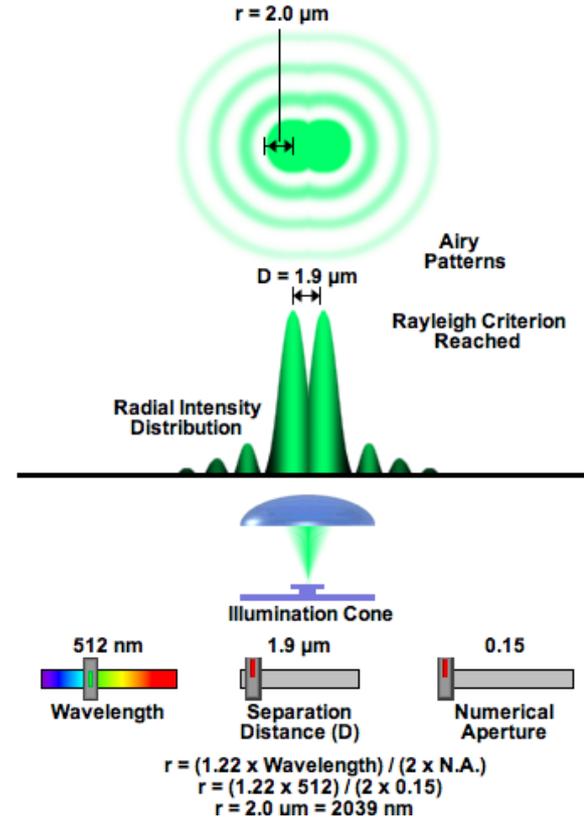
Maggiore ingrandimento/AN



Limite di Rayleigh



OK



Troppo vicino

Potere di risoluzione

Leggi di risoluzione per gli obiettivi di un microscopio:

- $d = 0.61 \lambda / NA_{\text{obj}}$
 - d = distanza minima risolta in μm
 - Quando AN del condensatore $>$ AN dell'obiettivo
- $d = 1.22 \lambda / NA_{\text{cond}} + NA_{\text{obj}}$
 - d = distanza minima risolta in μm
 - Quando AN del condensatore \leq AN dell'obiettivo

Contrasto di interferenza differenziale

Trasforma differenze in percorsi ottici in differenze in intensità, generando contrasto.

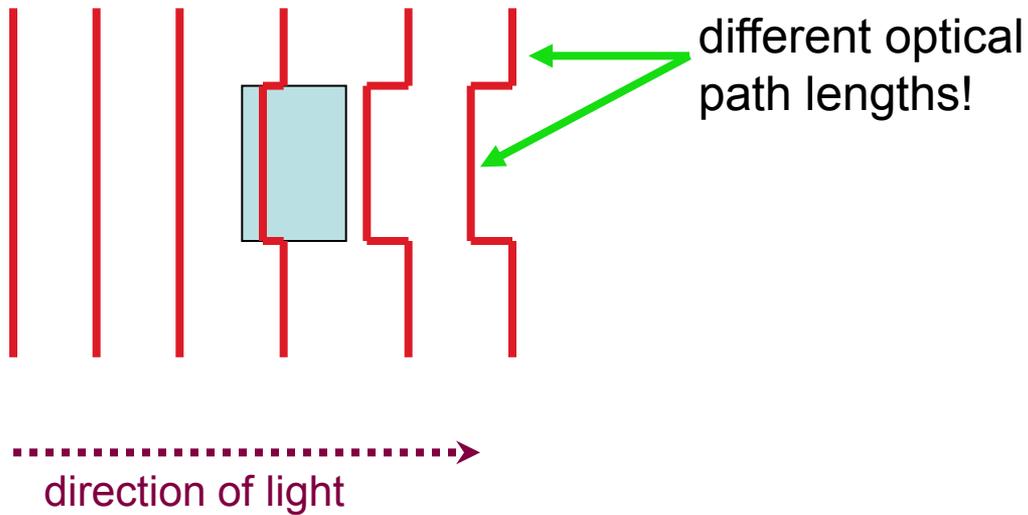
- OPL (lunghezza di passo ottico) = $n \cdot d$
 - n = indice di rifrazione
 - d = distanza percorsa dall'onda
 - n.b. – distanza percorsa dall'onda è determinata dallo spessore del campione
- Spessore del campione e materiale contribuiscono all' OPL

Passo ottico

- N più grande \rightarrow OPL più lungo
- Campione più spesso \rightarrow OPL più lungo
- OPL dipende anche dalle lunghezze d'onda

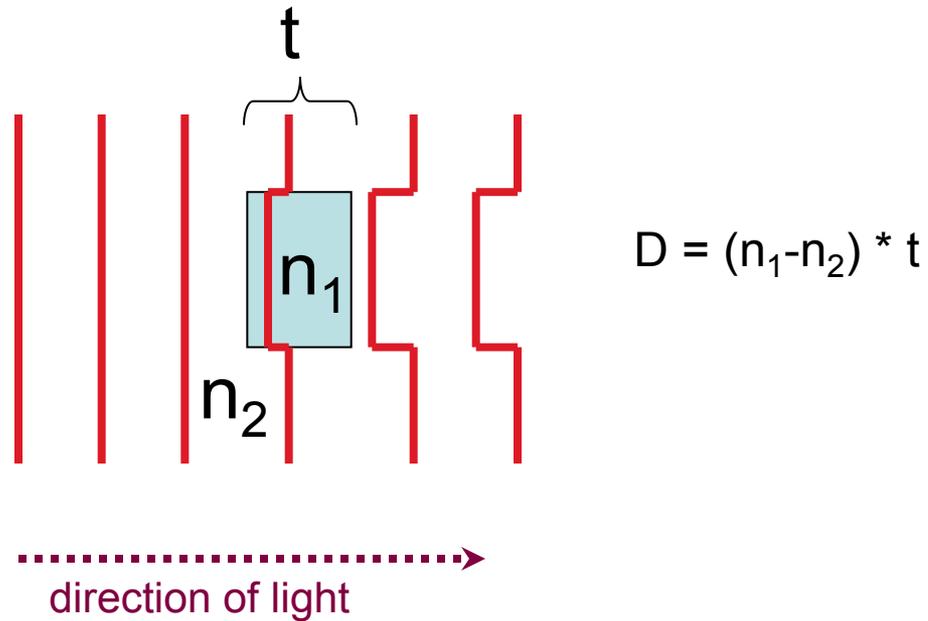
Passo ottico

Passo ottico dei fronti d'onda attraverso un campione in soluzione acquosa



Passo ottico

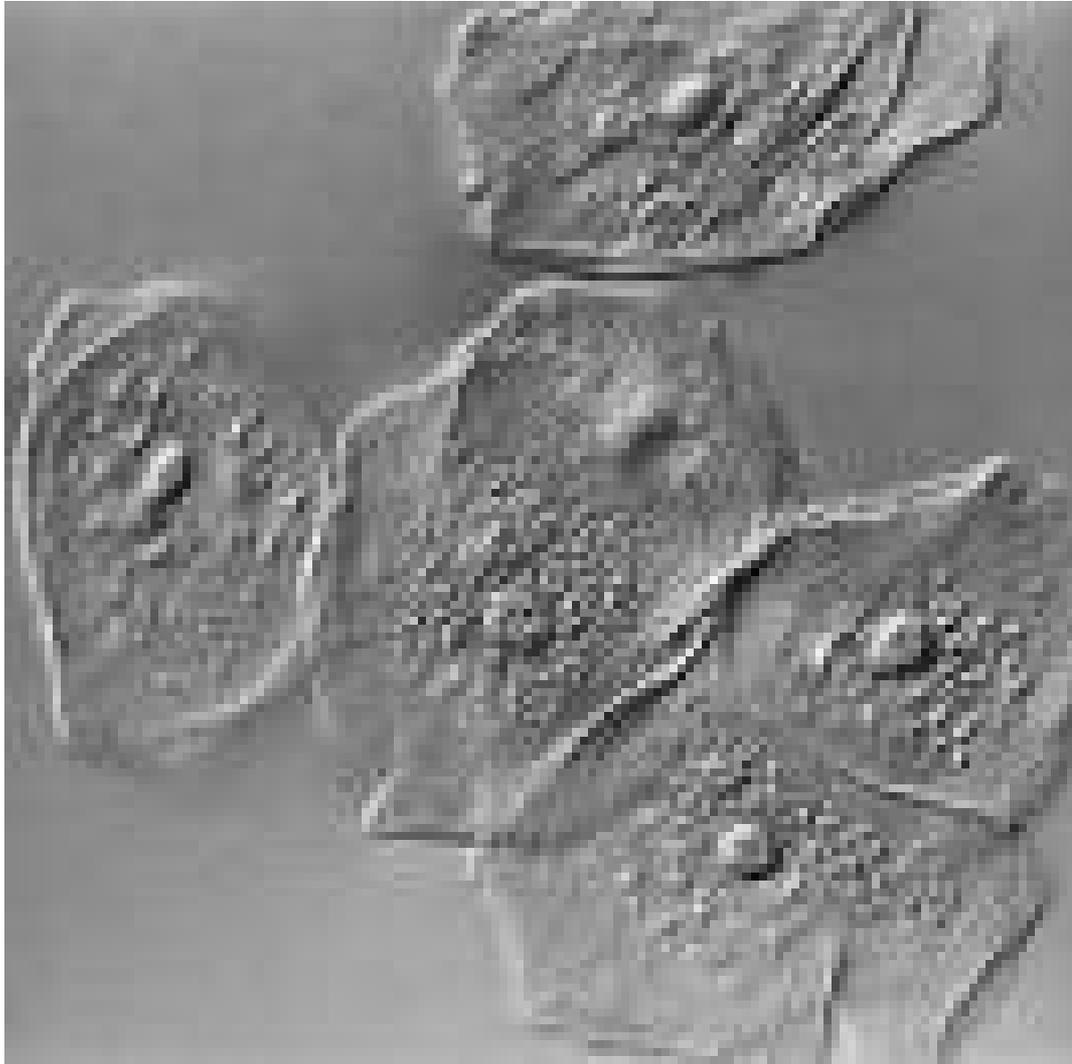
D= differenza in passo ottico (D) possono dare un contrasto particolare



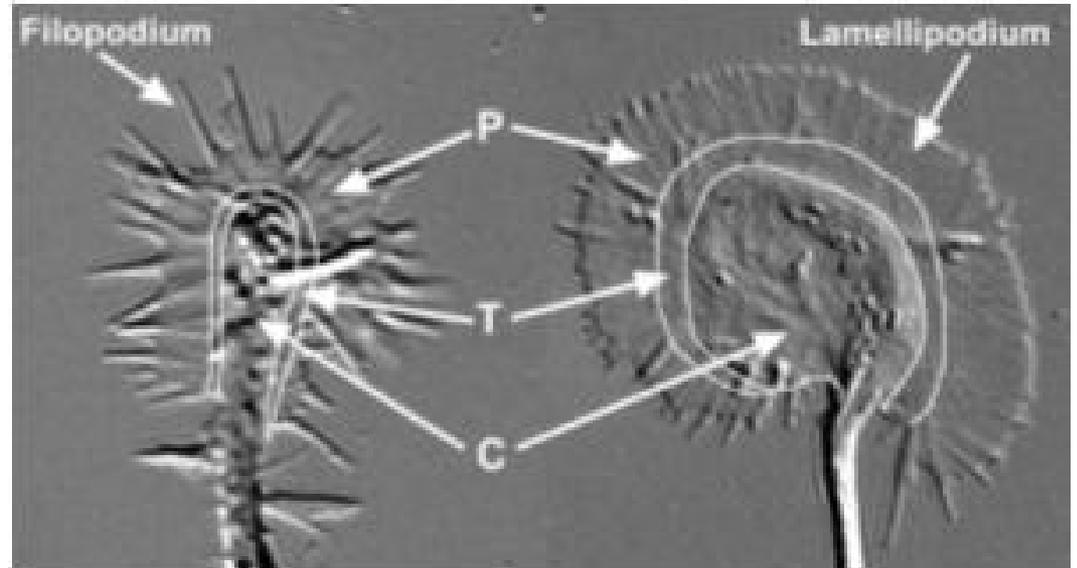
DIC: contrasto interferenziale



DIFFERENTIAL INTERFERENCE CONTRAST



DIFFERENTIAL INTERFERENCE CONTRAST



DIFFERENTIAL INTERFERENCE CONTRAST



Empty Magnification



(a)

Obiettivo=20x (AN=0.4)
ingrandito 10x



(b)

Figure 7

Obiettivo=4x (AN=0.1)
ingrandito 50x

Range di Ingrandimenti utili (500-1000 x AN dell' Obiettivo)

Obiettivo (NA)	Oculare				
	10x	12.5x	15x	20x	25x
2.5X (0.08)	---	---	---	x	x
4X (0.12)	---	---	x	x	x
10X (0.35)	x	x	x	x	x
25X (0.55)	x	x	x	x	---
40X (0.70)	x	x	x	---	---
60X (0.95)	x	x	x	---	---
100X (1.40)	x	x	---	---	---

x = combinazione buona

Limite di risoluzione di un microscopio

$$\lambda = 450nm \text{ (blu)}$$

$$N = 1.5 \text{ (indice di rifrazione dell' olio)}$$

$$\alpha = 70^\circ \text{ (massima apertura circolare per obiettivo)}$$

$$\sin \alpha = 0.94$$

$$D = \frac{(0.61 * 450nm)}{1.5 * 0.94} = 194nm \cong 0.2 \mu m$$

Per aumentare la risoluzione bisogna usare lunghezze d'onda più piccole

Profondità di campo

La **profondità di campo** rappresenta la distanza fra due piani, al di sopra ed al di sotto del campione da osservare, messi contemporaneamente a fuoco dall'obiettivo.

È piuttosto evidente che, se il campione da esaminare ha un certo spessore e l'obiettivo ha una profondità di campo ridotta, si potranno avere delle difficoltà nella messa a fuoco

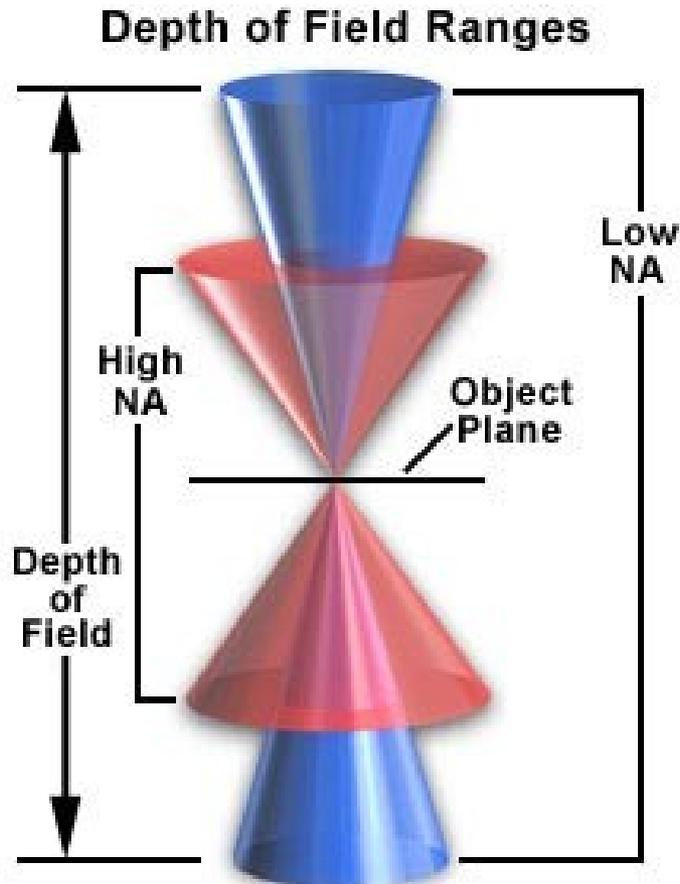


Figure 1

La profondità di campo è **inversamente proporzionale alla AN dell'obiettivo**, per cui ad es. un obiettivo ad immersione 100X (AN 1,25) ha una PdC di $0,15 \mu\text{m}$, mentre un obiettivo a secco da 25X (AN 0,40) ha una PdC di $0,4 \mu\text{m}$.

Profondità di campo

Durante l'osservazione dei campioni citologici ed ematologici la PdC non rappresenta generalmente un problema perché spesso troviamo sul vetrino cellule disposte in monostrato.

Profondità di campo totale:

$$d_{\text{tot}} = \frac{\lambda_0 n}{NA^2} + \frac{n}{M \cdot NA} e$$

Dall'altra parte dell'obiettivo, in corrispondenza dell'osservatore, si trova il piano di fuoco dell'immagine: il range di messa a fuoco dell'immagine è chiamato **profondità di fuoco**. Questo parametro ha importanza analoga al PdC, ma presenta una importante differenza: aumentando il potere di ingrandimento dell'obbiettivo la PdC diminuisce, mentre la PdF invece aumenta.

Stereomicroscopia: bi-oculare

Illuminazione Riflessa (Episcopica) – Gli stereomicroscopi sono spesso utilizzati per esaminare campioni attraverso entrambi gli schemi di illuminazione: luce riflessa (**episcopica**) e luce trasmessa (**diascopica**). Si possono quindi utilizzare una serie di diverse sorgenti di luce e configurazioni.

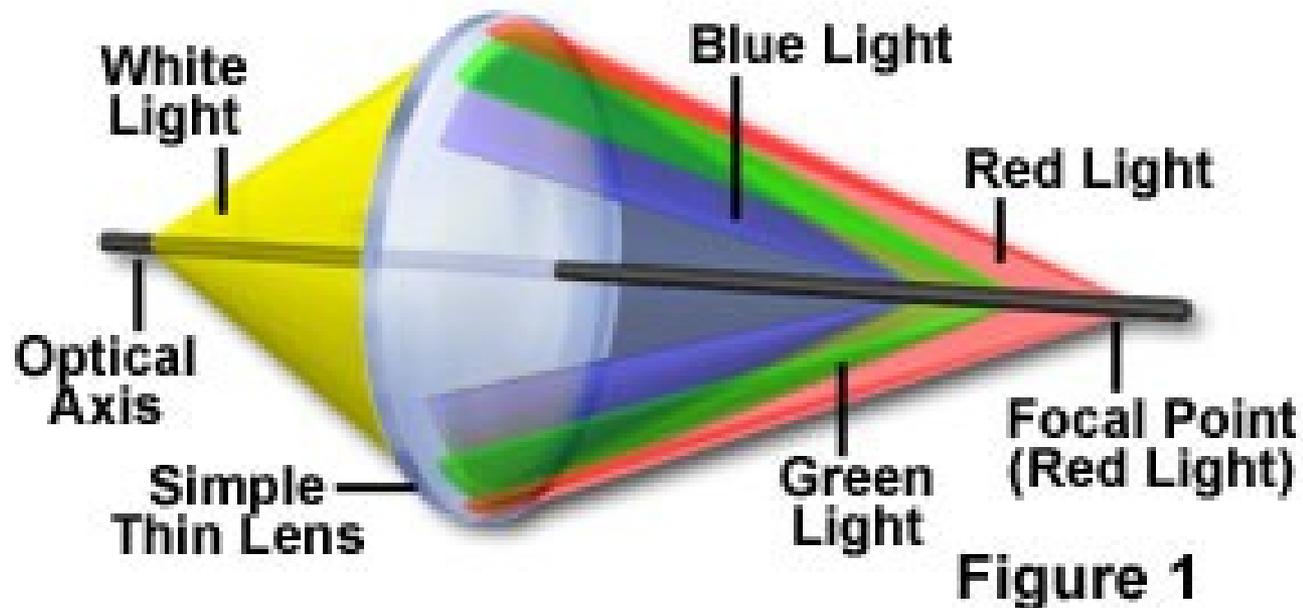
Spesso luce trasmessa e riflessa sono combinate in modo da mettere in evidenza questa o quella particolare caratteristica del campione.

Illuminazione Obliqua – Campioni che sono quasi trasparenti e senza colori risultano invisibili con stereomicroscopi diascopici. Se l'illuminazione è diretta in modo da colpire il campione con un'angolo obliquo si può aumentare il contrasto.

Aberrazioni ottiche nelle lenti

Aberrazione cromatica assiale

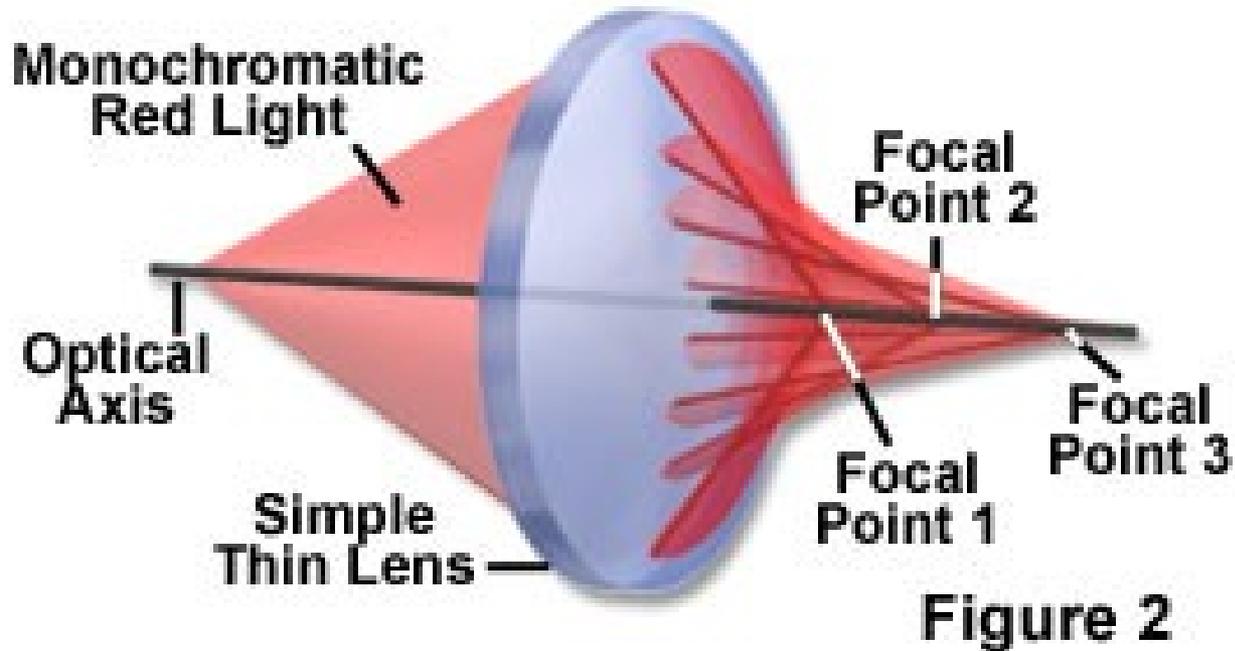
Axial Chromatic Aberration



Da luogo ad un alone colorato attorno al punto di fuoco.

Aberrazione sferica

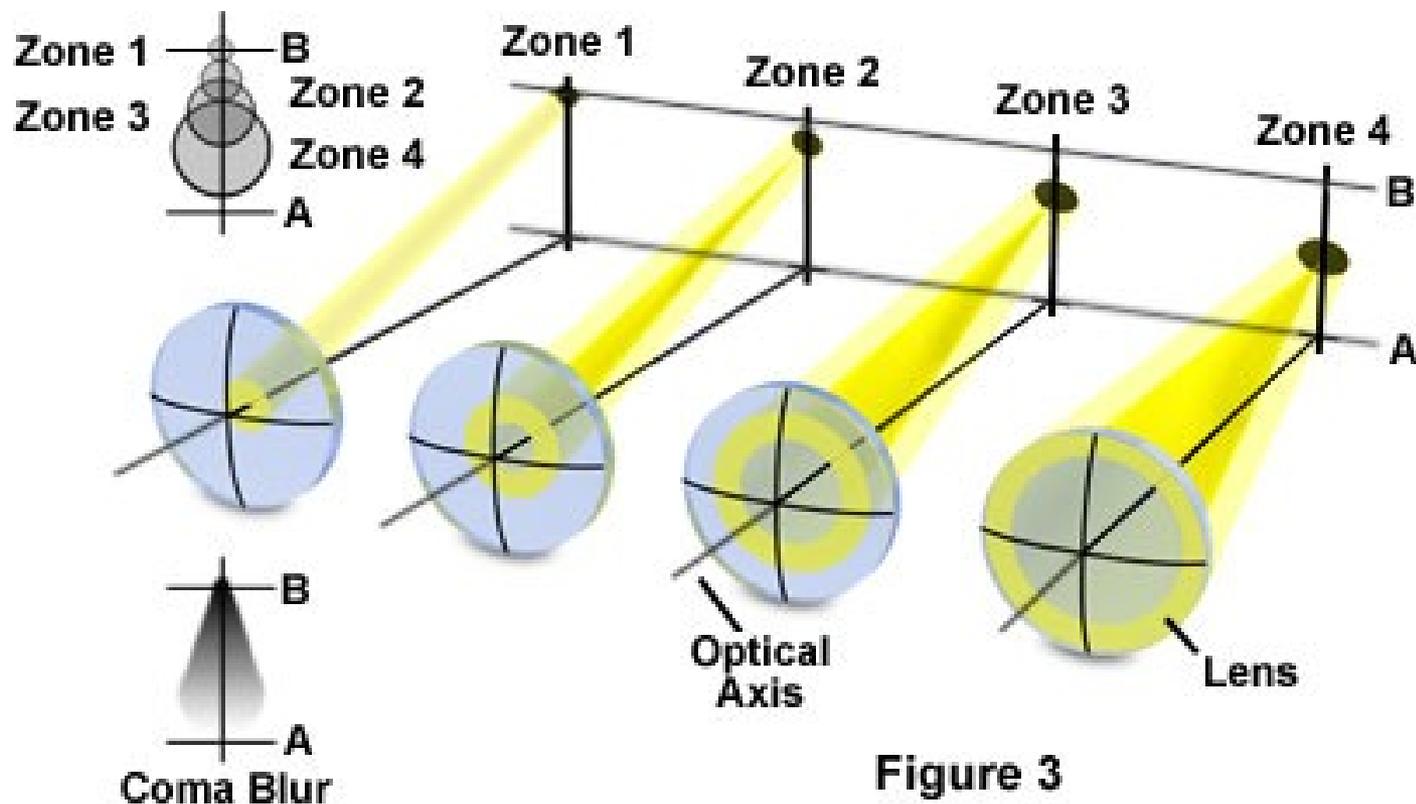
Spherical Aberration



Da luogo ad un alone attorno al punto di fuoco.

Aberrazione comatica

Off-Axis Coma Aberration



Se le lenti del microscopio non sono perfettamente allineate ed il raggio e' fuori asse: e' piu' evidente per aperture numeriche grandi.

Astigmatismo

Astigmatism Aberration

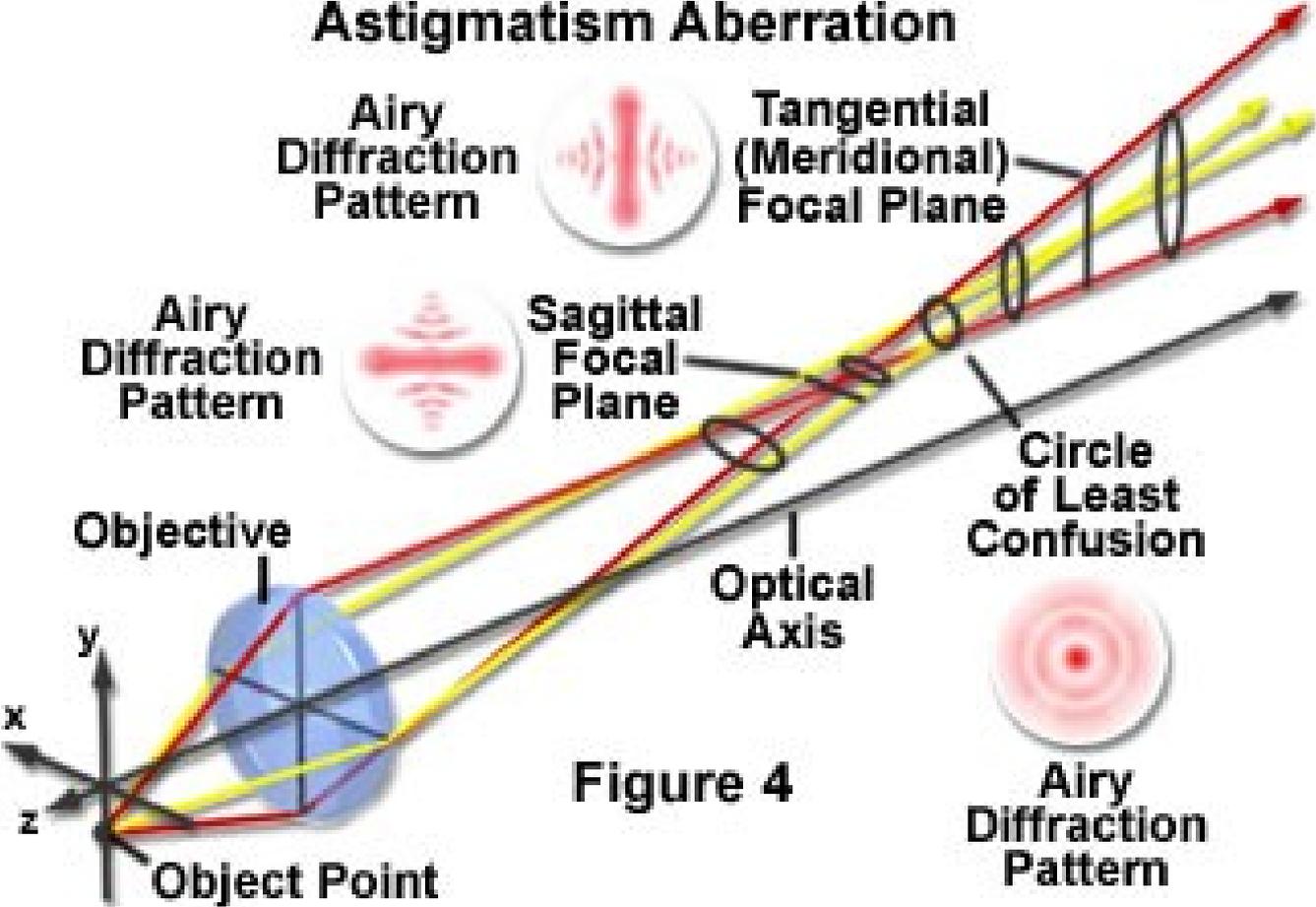
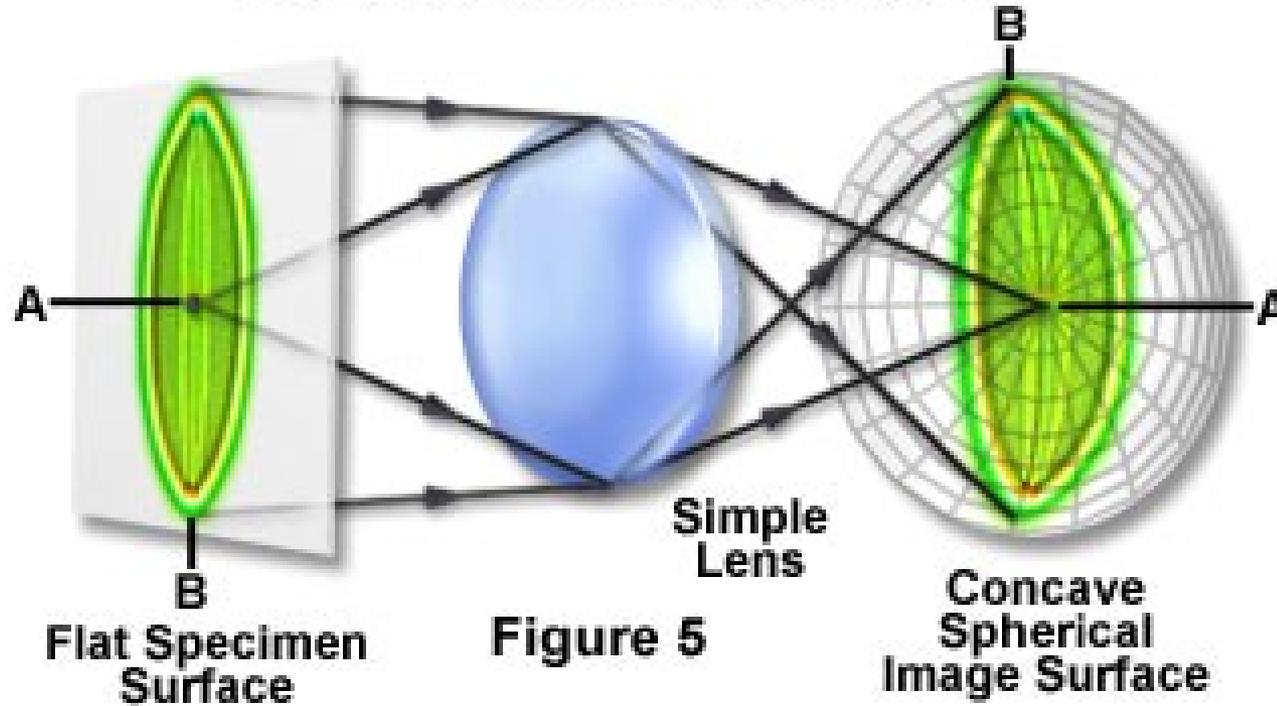


Figure 4

Aberrazione di curvatura di campo

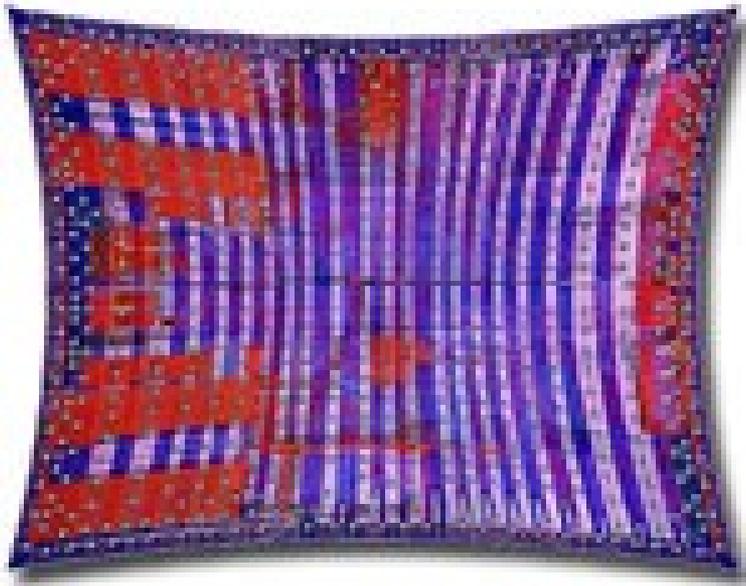
Field Curvature Aberration



Superfici curve: l'immagine risulta distorta secondo la curvatura della lente.

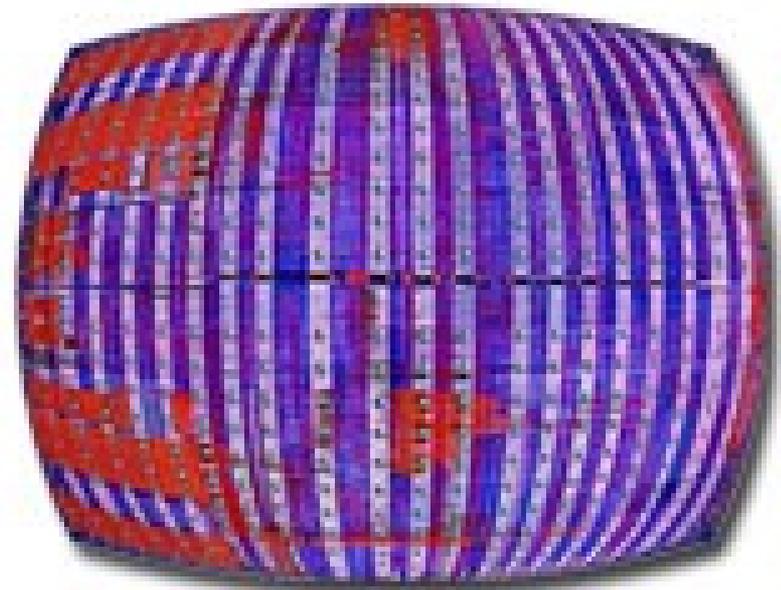
Distorsione geometrica

Geometric Distortion



Pincushion

Positiva



Barrel

Negativa

Figure 6

60x Plan Apochromat Objective

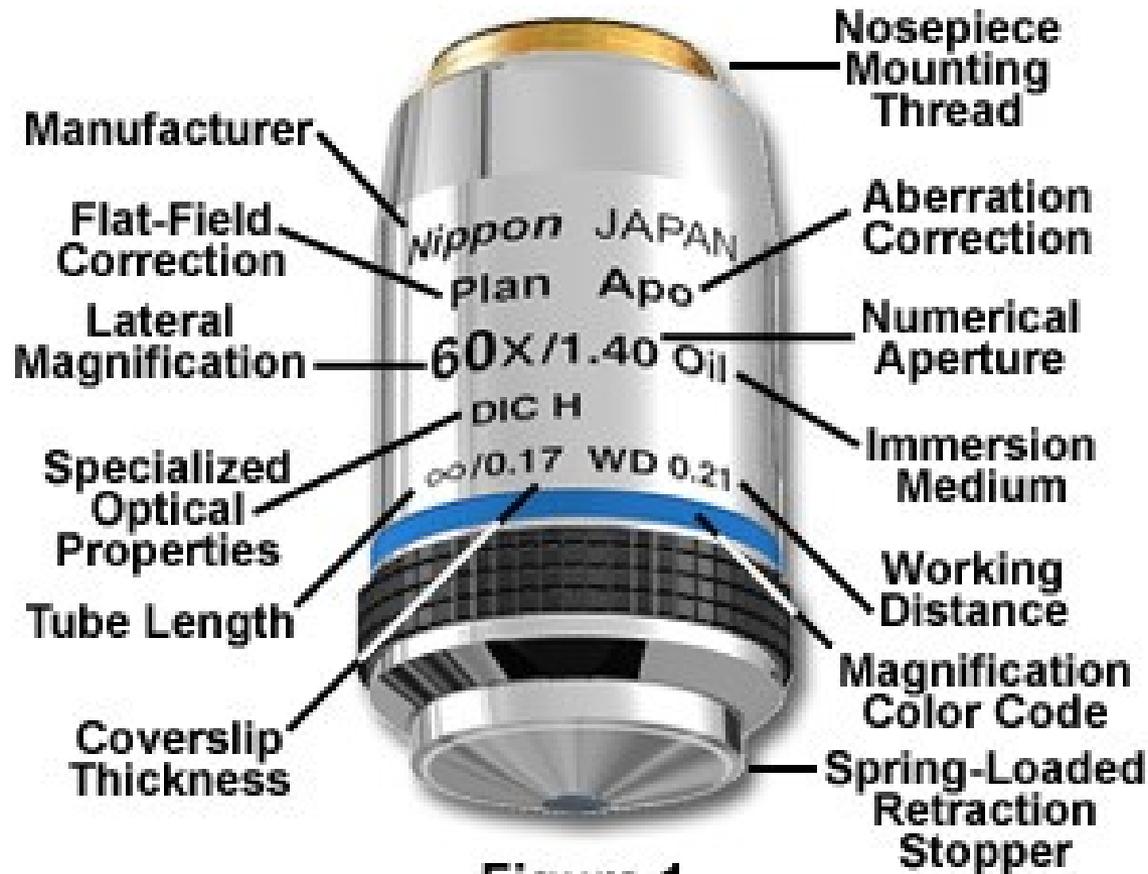


Figure 1

Correzioni ottiche

- **Achro** and **Achromat** (acromatico), come **FI**, **Fluar**, **Fluor**, **Neofluar**, o **Fluotar** (fluorite) per correzioni sferiche e cromatiche
- **Apo** (apocromatico) per il più alto grado di correzione per le aberrazioni sferiche e cromatiche
- Correzioni per curvature di campo sono abbreviate come **Plan**, **PI**, **EF**, **Achroplan**, **Plan Apo**, or **Plano**.

Stereomicroscopia: bi-oculare

Illuminazione Riflessa (Episcopica) – Gli stereomicroscopi sono spesso utilizzati per esaminare campioni attraverso entrambi gli schemi di illuminazione: luce riflessa (**episcopica**) e luce trasmessa (**diascopica**). Si possono quindi utilizzare una serie di diverse sorgenti di luce e configurazioni.

Spesso luce trasmessa e riflessa sono combinate in modo da mettere in evidenza questa o quella particolare caratteristica del campione.

Illuminazione Obliqua – Campioni che sono quasi trasparenti e senza colori risultano invisibili con stereomicroscopi diascopici. Se l'illuminazione è diretta in modo da colpire il campione con un'angolo obliquo si può aumentare il contrasto.

Aperture numeriche degli obiettivi

Magnification	Plan Achromat (NA)	Plan Fluorite (NA)	Plan Apochromat (NA)
0.5x	0.025	n/a	n/a
1x	0.04	n/a	n/a
2x	0.06	n/a	0.10
4x	0.10	0.13	0.20
10x	0.25	0.30	0.45
20x	0.40	0.50	0.75
40x	0.65	0.75	0.95
40x (oil)	n/a	1.30	1.00
60x	0.75	0.85	0.95
60x (oil)	n/a	n/a	1.40
100x (oil)	1.25	1.30	1.40
150x	n/a	n/a	0.90

Risoluzione ed apertura numerica per tipo di obiettivo

Ingrandimento	Tipo di obiettivo					
	Plan Achromat		Plan Fluorite		Plan Apochromat	
	N.A	Risoluzione (µm)	N.A	Risoluzione (µm)	N.A	Risoluzione (µm)
4x	0.10	2.75	0.13	2.12	0.20	1.375
10x	0.25	1.10	0.30	0.92	0.45	0.61
20x	0.40	0.69	0.50	0.55	0.75	0.37
40x	0.65	0.42	0.75	0.37	0.95	0.29
60x	0.75	0.37	0.85	0.32	0.95	0.29
100x	1.25	0.22	1.30	0.21	1.40	0.20

N.A. = Apertura numerica

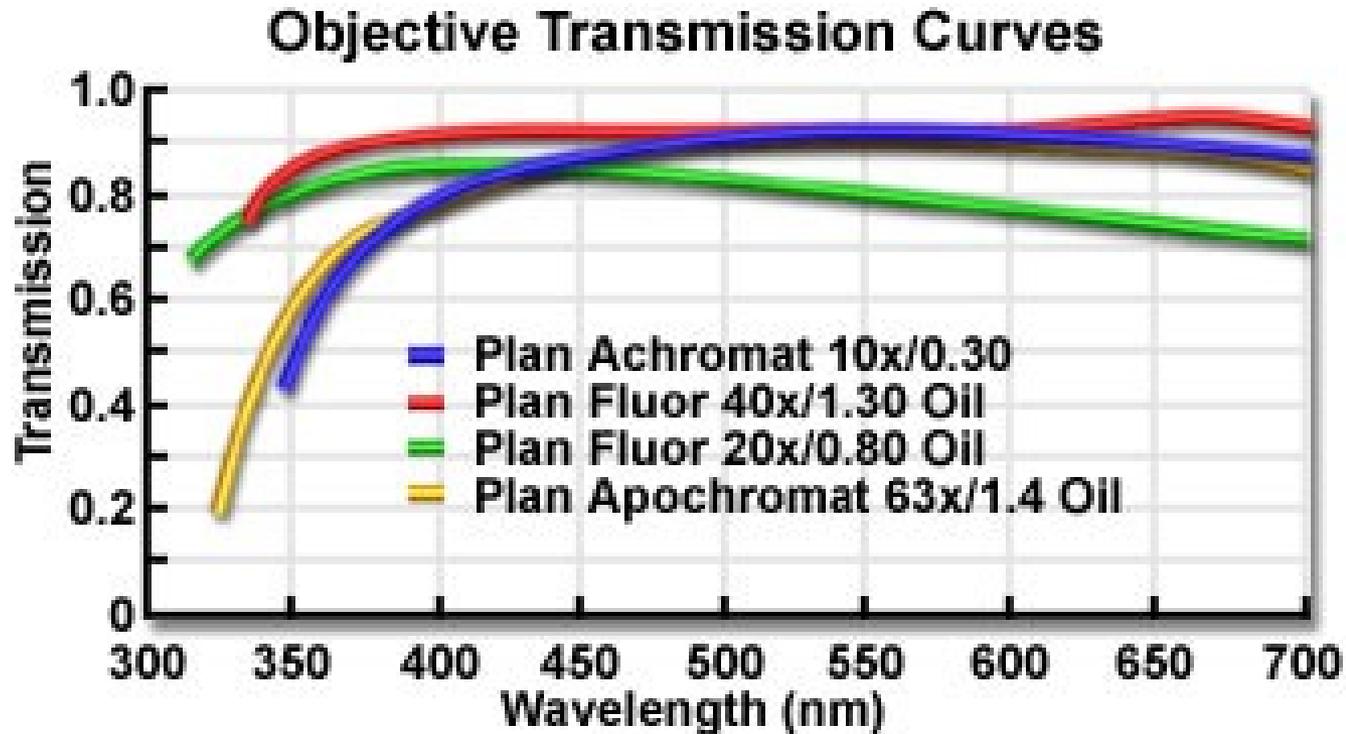


Figure 1

Luminosita' dell'immagine $\propto (NA/M)^2$

dove **NA** è l'apertura numerica dell'obiettivo e **M** è il fattore di ingrandimento

Fattore di intensita' luminosa dell'obiettivo:

In modo diascopico: $F(\text{dia}) = 10^4 \cdot \text{NA}^2/\text{M}^2$

In modo episcopico: $F(\text{epi}) = 10^4 \cdot (\text{NA}^2/\text{M})$

Correction	Magnification	Numerical Aperture	F(dia)	F(epi)
Plan Achromat	10x	0.25	6.25	0.39
Plan Fluorite	10x	0.30	9.00	0.81
Plan Apo	10x	0.45	20.2	4.10
Plan Achromat	20x	0.40	4.00	0.64
Plan Fluorite	20x	0.50	6.25	1.56
Plan Apo	20x	0.75	14.0	7.90
Plan Achromat	40x	0.65	2.64	1.11
Plan Fluorite	40x	0.75	3.52	1.98
Plan Apo	40x (oil)	1.30	11.0	18.0
Plan Fluorite	60x	0.85	2.01	1.45
Plan Apo	60x (oil)	1.40	5.4	10.6
Plan Apo	100x (oil)	1.40	1.96	3.84
Plan Apo	100x (oil)	1.45	2.10	4.42
Plan Apo	100x (oil)	1.65	2.72	7.41