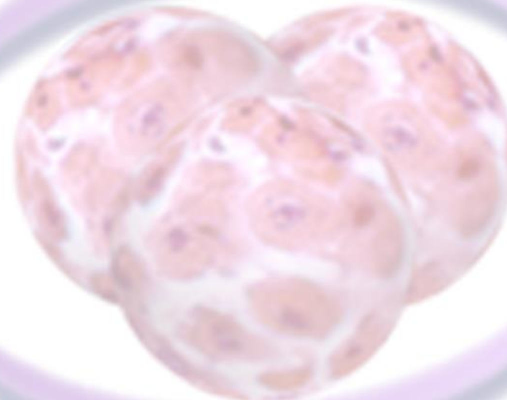
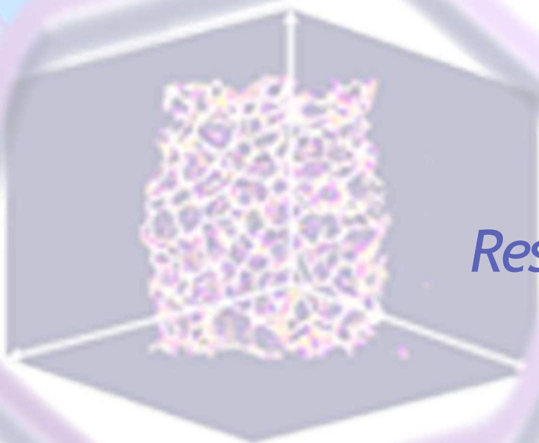


Ottica Biomedica



Prof. Arti Ahluwalia
Research Center "E. Piaggio"
University of Pisa

Outline

Lo scopo del corso è di approfondire aspetti tecnologici, teorici e sperimentali di ottica geometrica, microscopia e fluorescenza applicati allo studio di fenomeni biologici e biomedicali con particolare riguardo a luce visibile, infra rosso e ultra violetto.In particolare gli argomenti trattati sono:

- Le proprietà ottiche dei mezzi, il concetto dell'indice di rifrazione, legge di Snell, assorbanza e profondità di penetrazione. 3 ore
- Le lenti, la struttura e funzione dell'occhio, gli occhiali e lenti a contatto. 5 ore
- I concetti di risoluzione, apertura numerica, profondità di campo, contrasto. 3 ore
- Assorbanza e fluorescenza, e tecniche analitiche. 3 ore
- Tecniche ottiche: ellissometria, TIRF, SPR, ecc. 2 ore
- La microscopia con luce bianco, microscopia a fluorescenza, confocale, a due fotoni e ad alta risoluzione. 5 ore
- Utilizzo di ImageJ per elaborazione di imagini da microscopia. 6 ore
- Vista al laboratorio di Nano-Bioscopy con la possibilità di fotografare e poi elaborare immagini. 3 ore
- L'esame consiste in un breve orale e una prova di elaborazione di immagini con ImageJ o Matlab.
- Libro: Halliday Fondamenti di Fisica e lucidi forniti dal docente

Ottica Biomedica I

Luce, lenti, strumenti

Ottica biomedica II

Microscopia

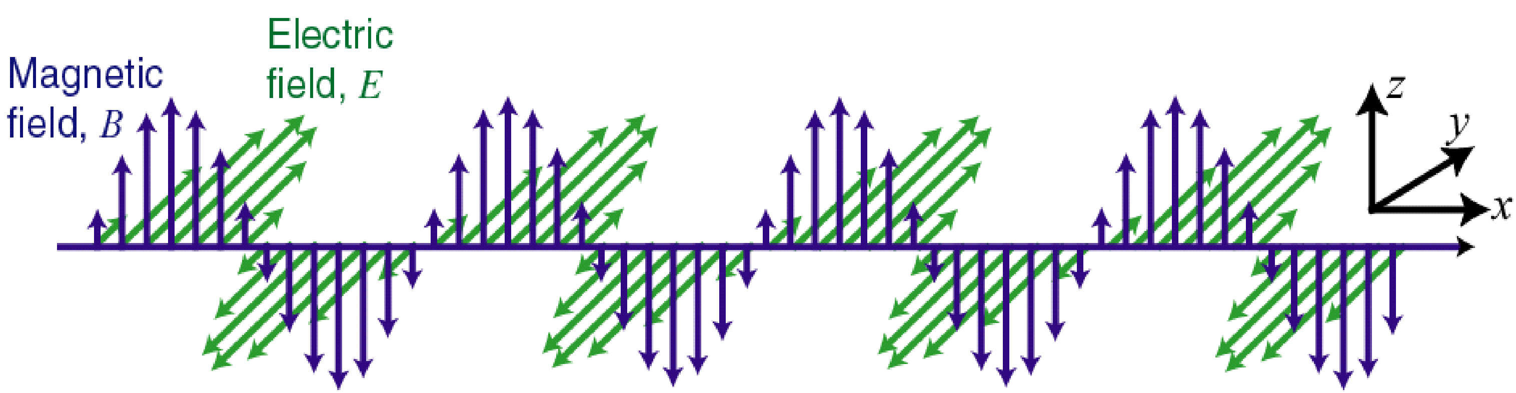
Questions

Cos’è la luce?

Come viene generato?

Come viene rivelato?

(no light, no matter- no matter, no light)



Cosa succede quando luce e materiali interagiscono?

Passa attraverso, ma si rallenta (rifrazione)

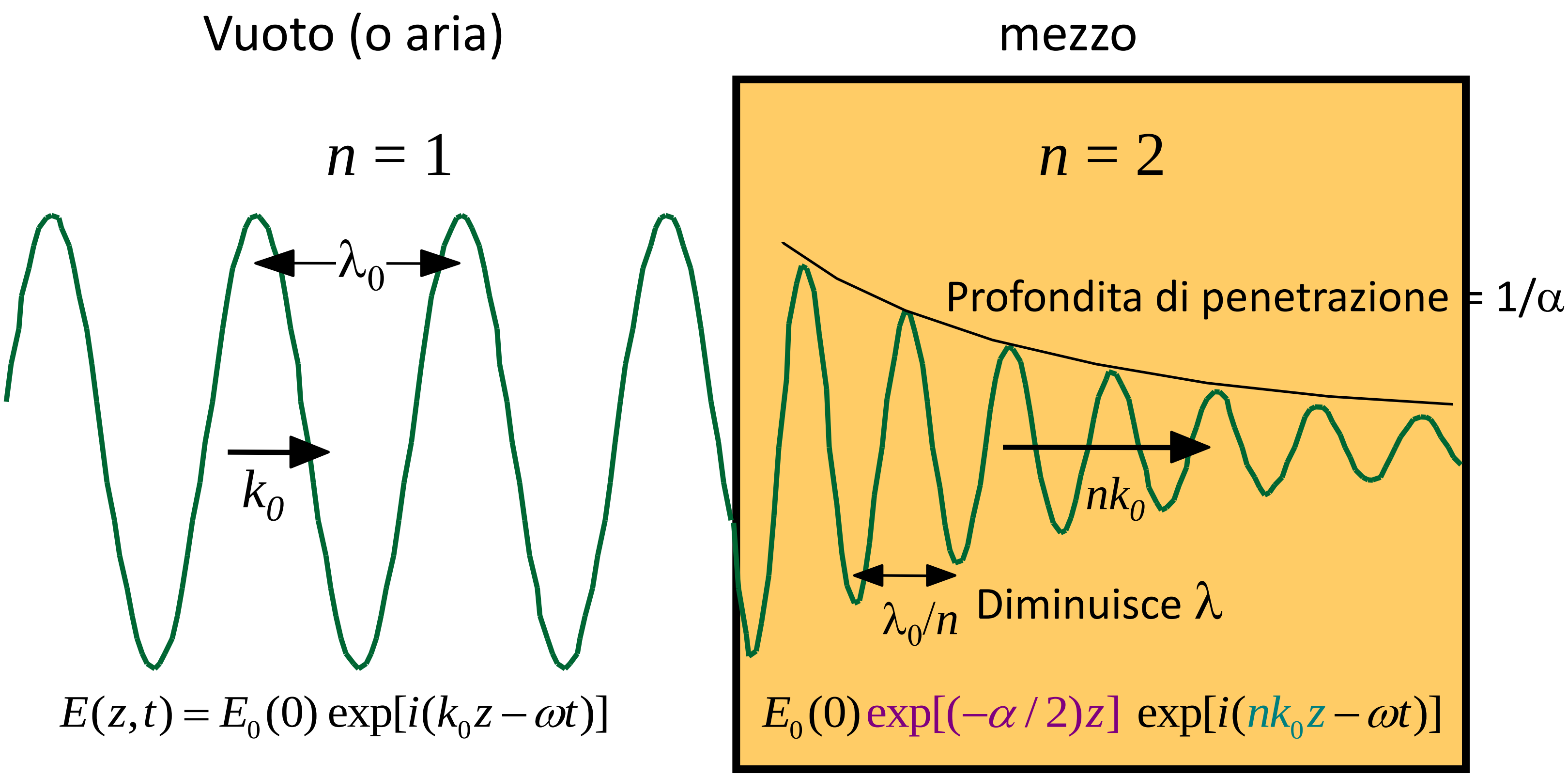
Riflette o “scatterato”

Viene assorbito

Possono anche succedere insieme

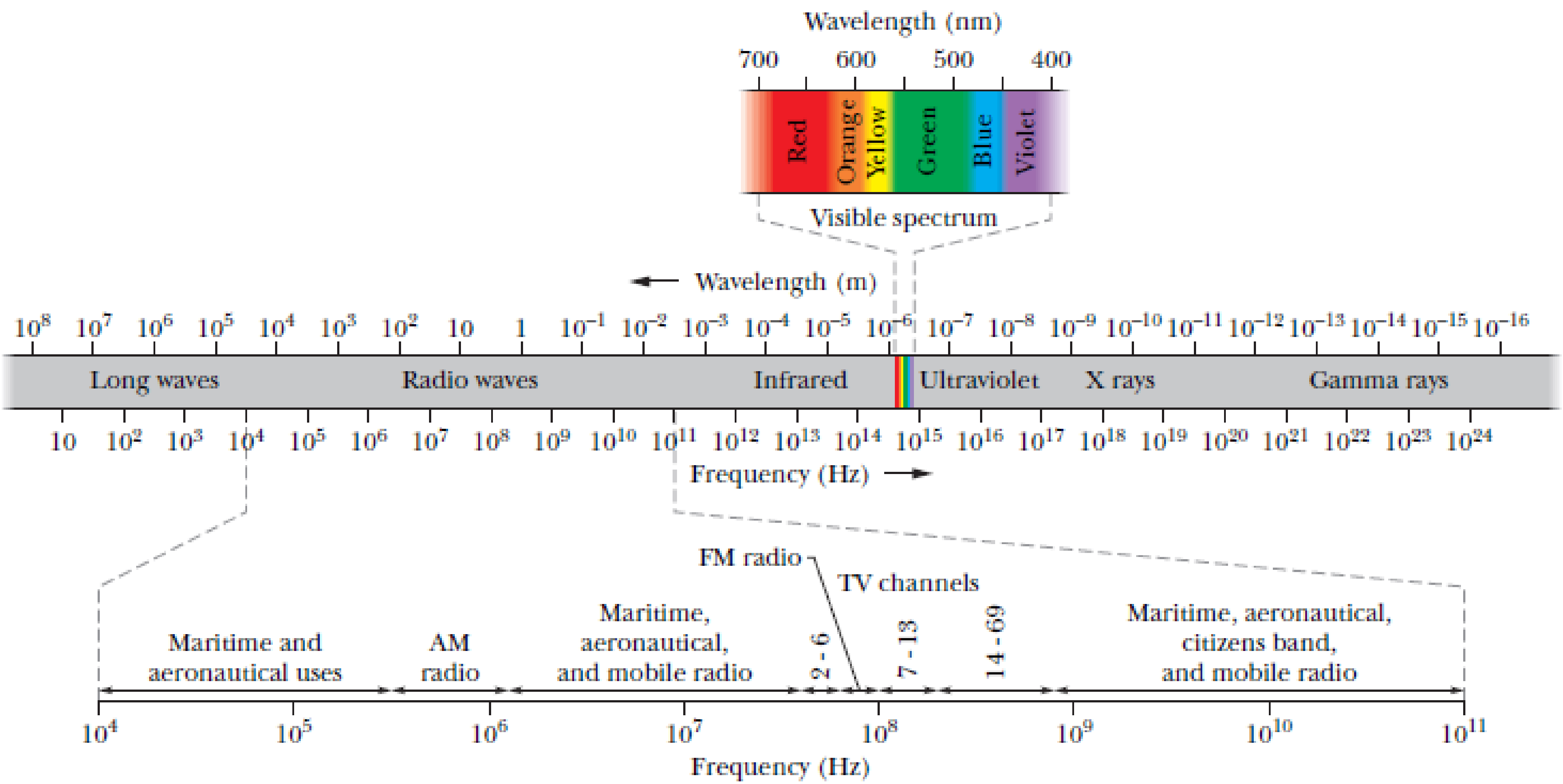
Altri fenomeni: diffrazione, fluorescenza, interferenza

Quando luce entra in un mezzo



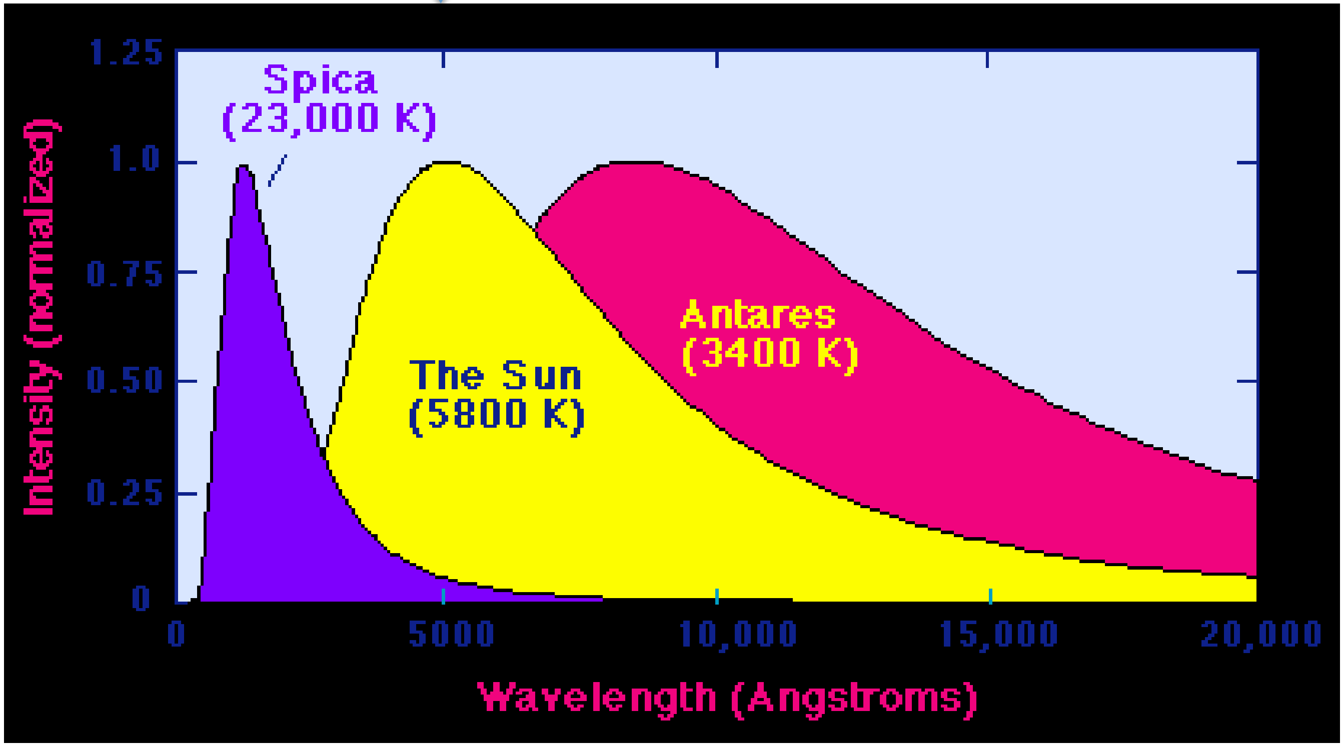
In generale, diminuisce la velocita', la lunghezza d'onda e l'ampiezza. Rimane invariata la frequenza.

Lo spettro em



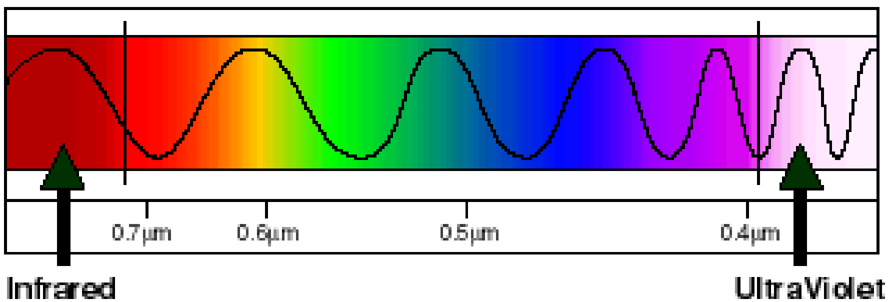
Spettro del Sole

giallo



Luce visibile

Visible Light Region
of the Electromagnetic Spectrum



Approximate Frequency and Vacuum Wavelength Ranges for the Various Colors

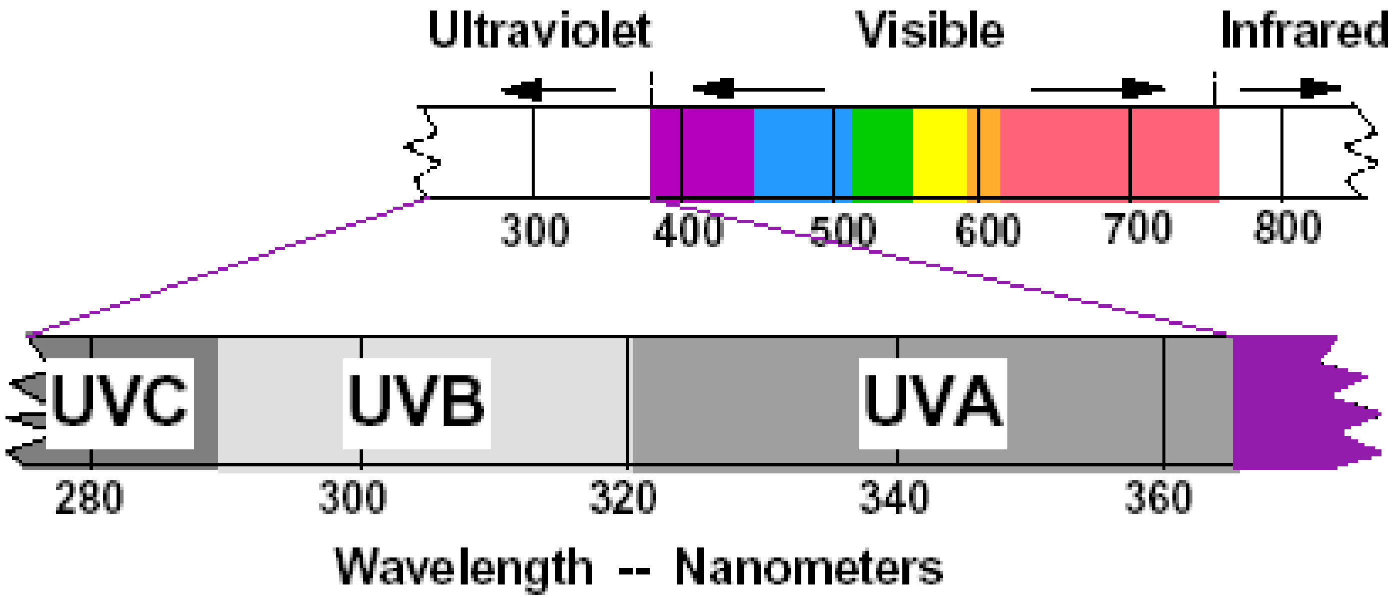
Color	λ_0 (nm)	ν (THz)*
Red	780–622	384–482
Orange	622–597	482–503
Yellow	597–577	503–520
Green	577–492	520–610
Blue	492–455	610–659
Violet	455–390	659–769

*1 terahertz (THz) = 10^{12} Hz, 1 nanometer (nm) = 10^{-9} m.

Ultravioletto

Lo spettro UV è divisio in 3 zone , UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm), e UVC (220-290 nm).

UVC è quasio completamente assorbito dall'atmosfera (dallo strato di O3)

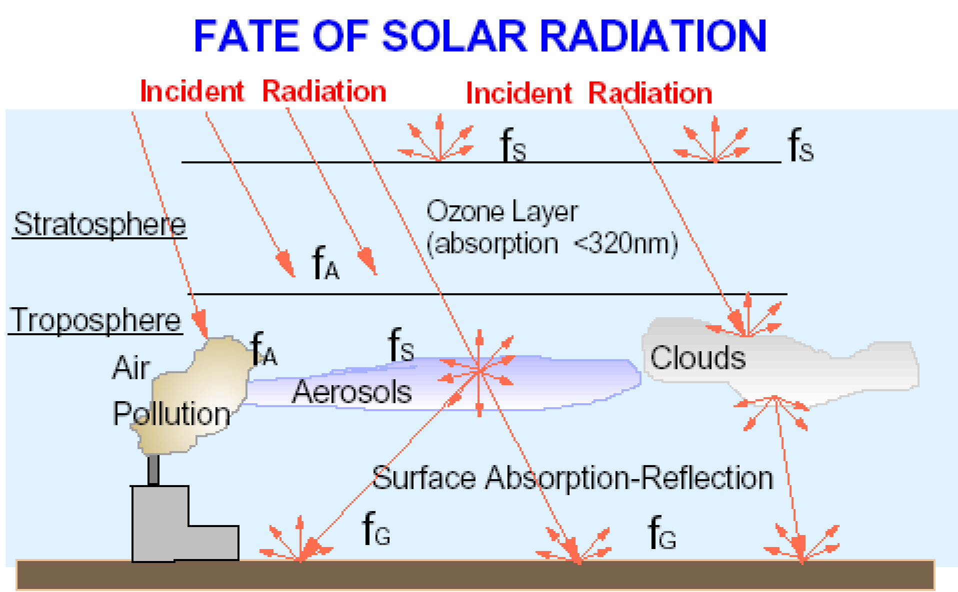


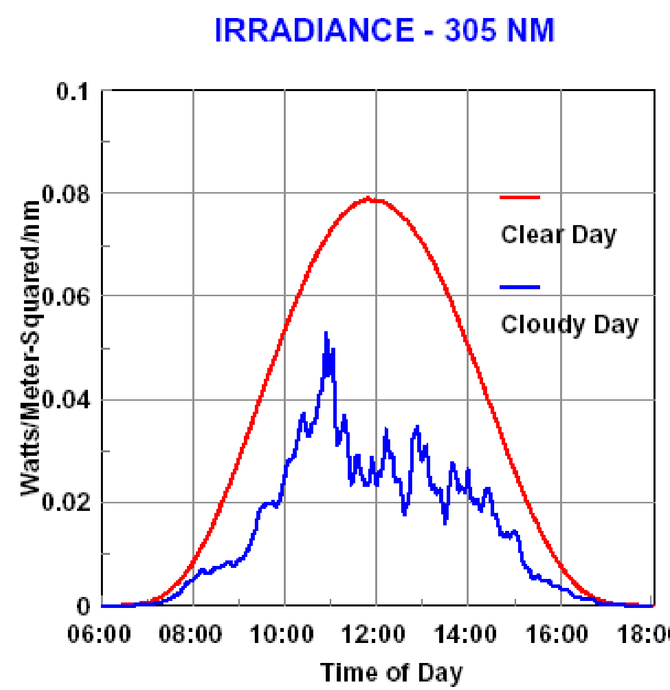
98% dei raggi solari di tipo UV che arrivano in terra sono UVA

UV dal sole

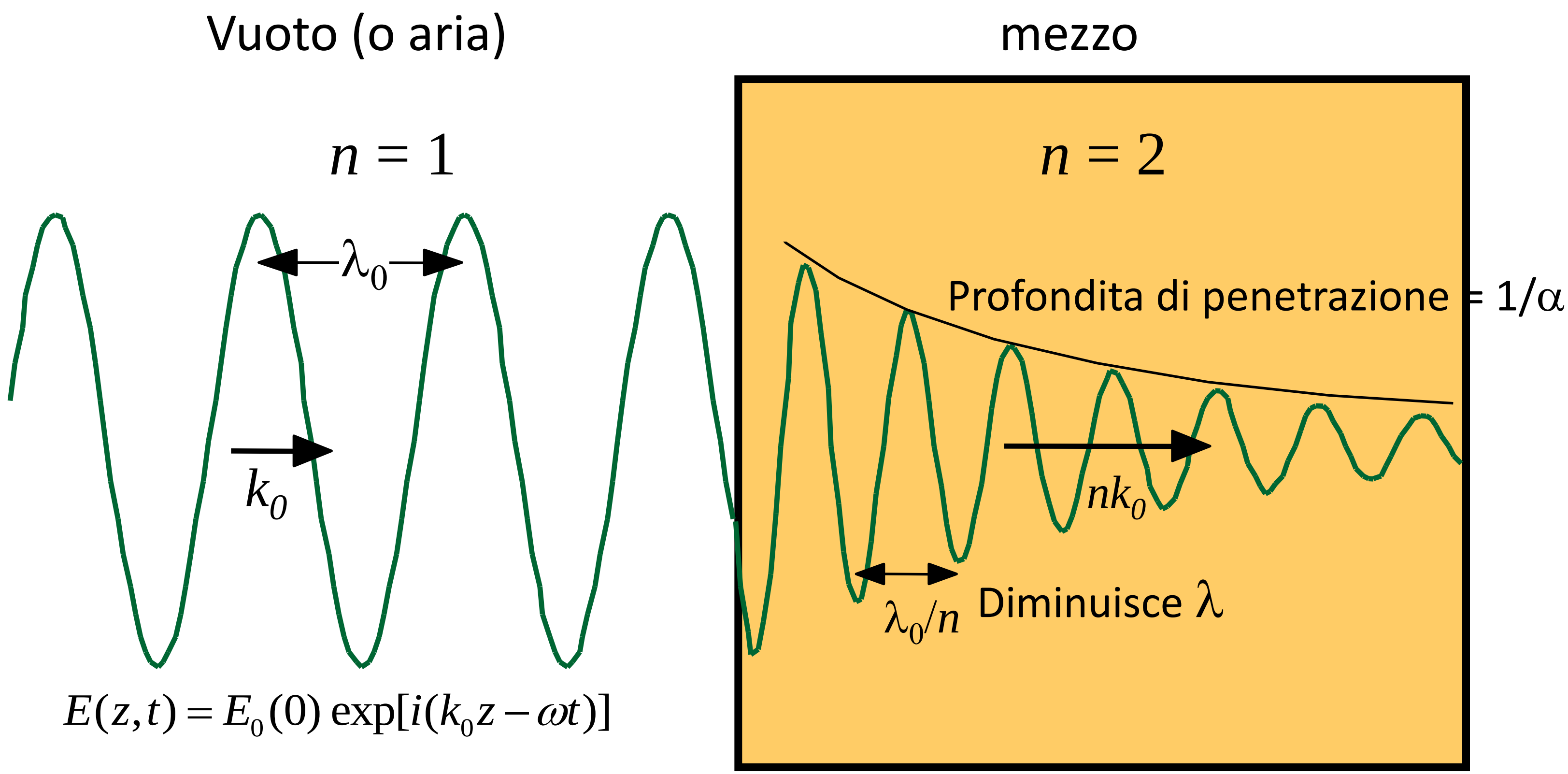
Lo strato di ozono assorbe lunghezze inferiori a 320 nm (UVB e UVC), e le nuvole scatterano il resto.

Ma l' UV (UVA, e un po di UVB) penetra e arriva a terra.





Quando luce entra in un mezzo

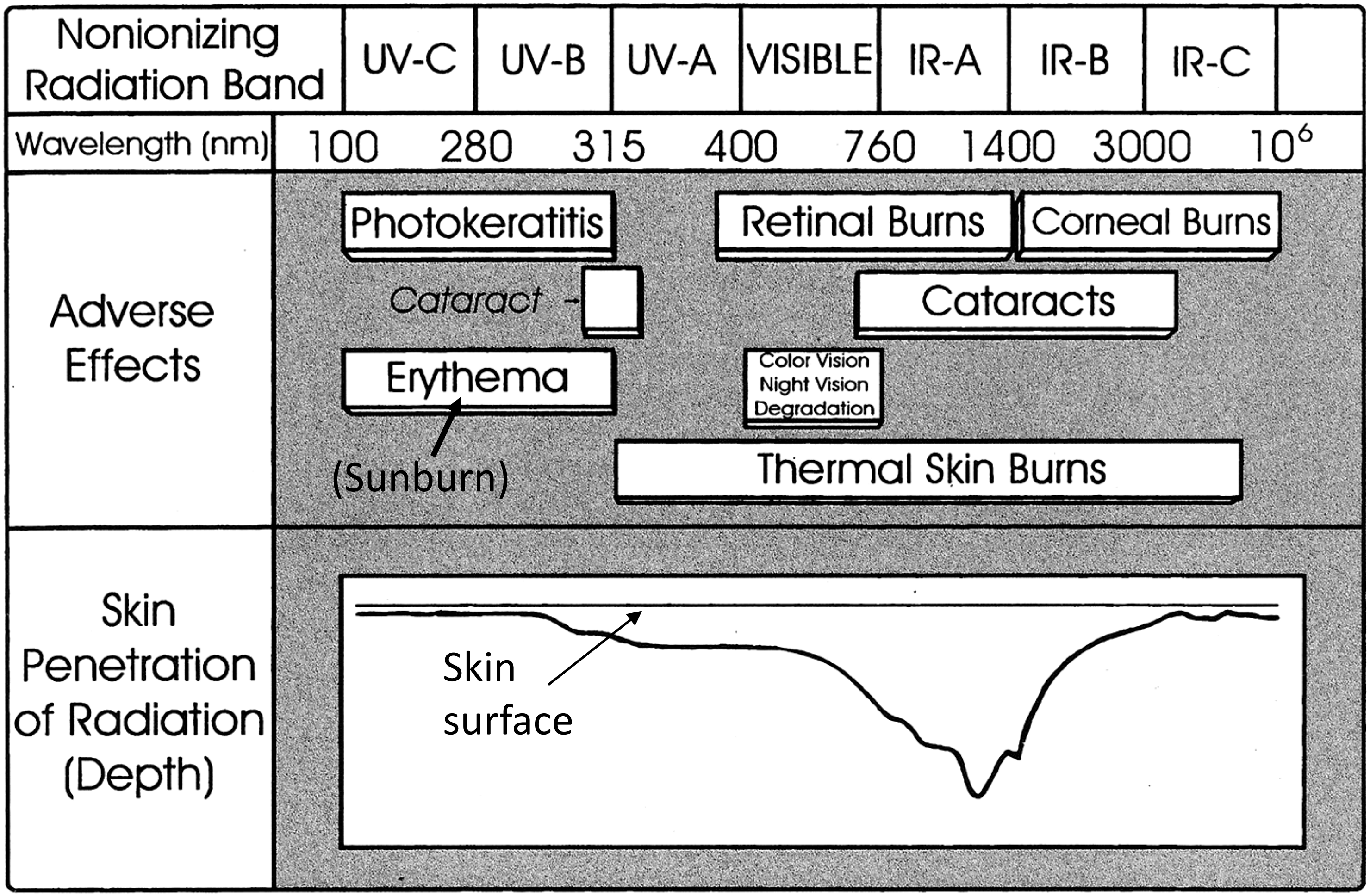


$$E(z,t) = E_0(0)\exp[i(k_0 z - \omega t)]$$

$$E_0(0)\exp[(-\alpha/2)z]\ \exp[i(nk_0 z - \omega t)]$$

In generale, diminuisce la velocita', la lunghezza d'onda e l'ampiezza.
Rimane invariata la frequenza.

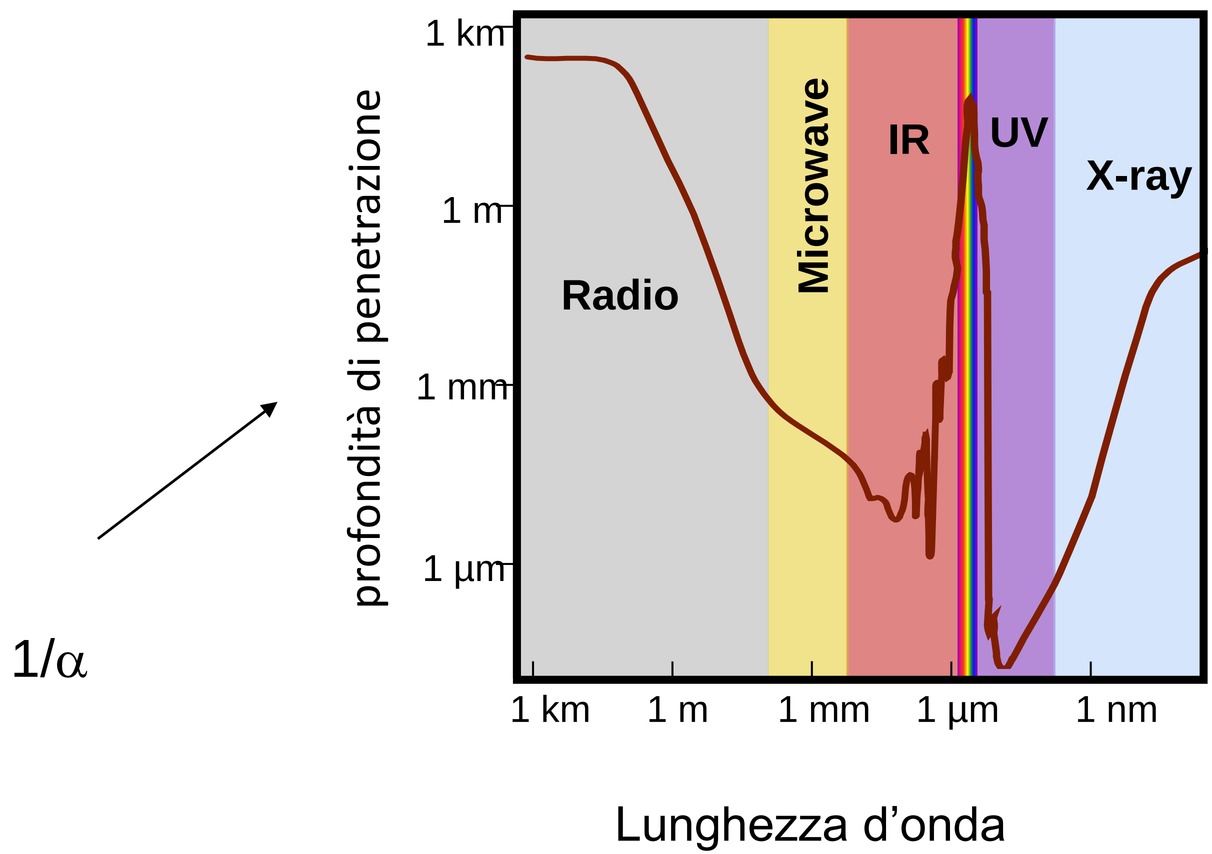
La pelle



La pelle è opaco nell’UV e visibile, non nell’IR.

Acqua

Acqua,

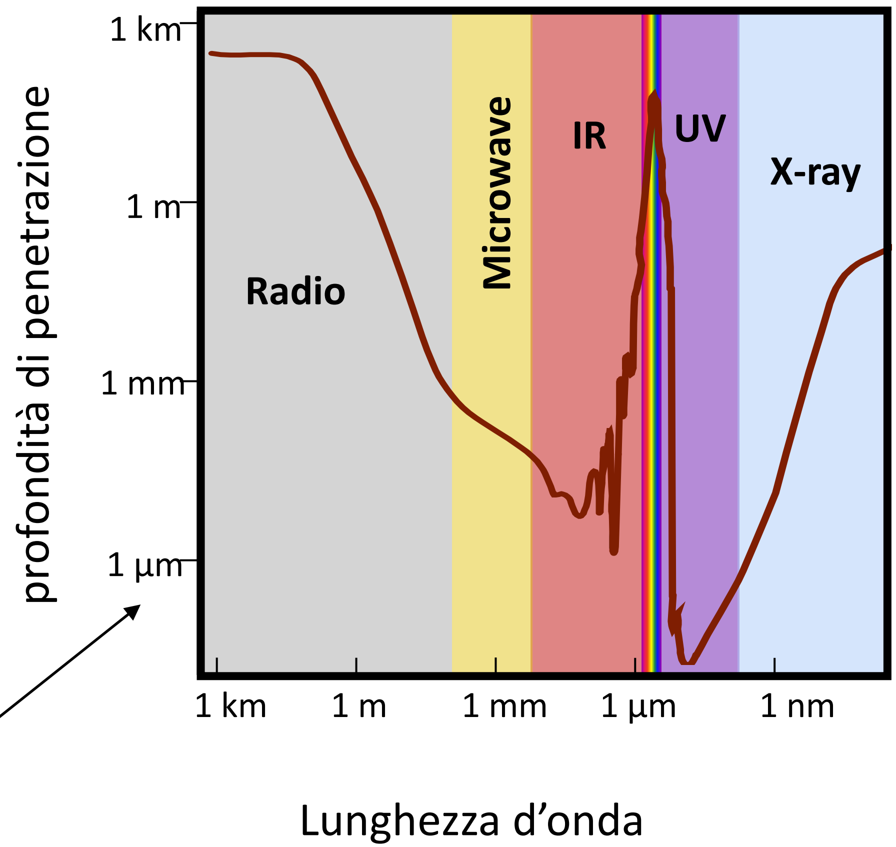


La presenza di Sali e inquinamenti cambia molto lo spettro- la profondità di penetrazione diminusce molto nel mare

Microonde : f= 2.45 GHz

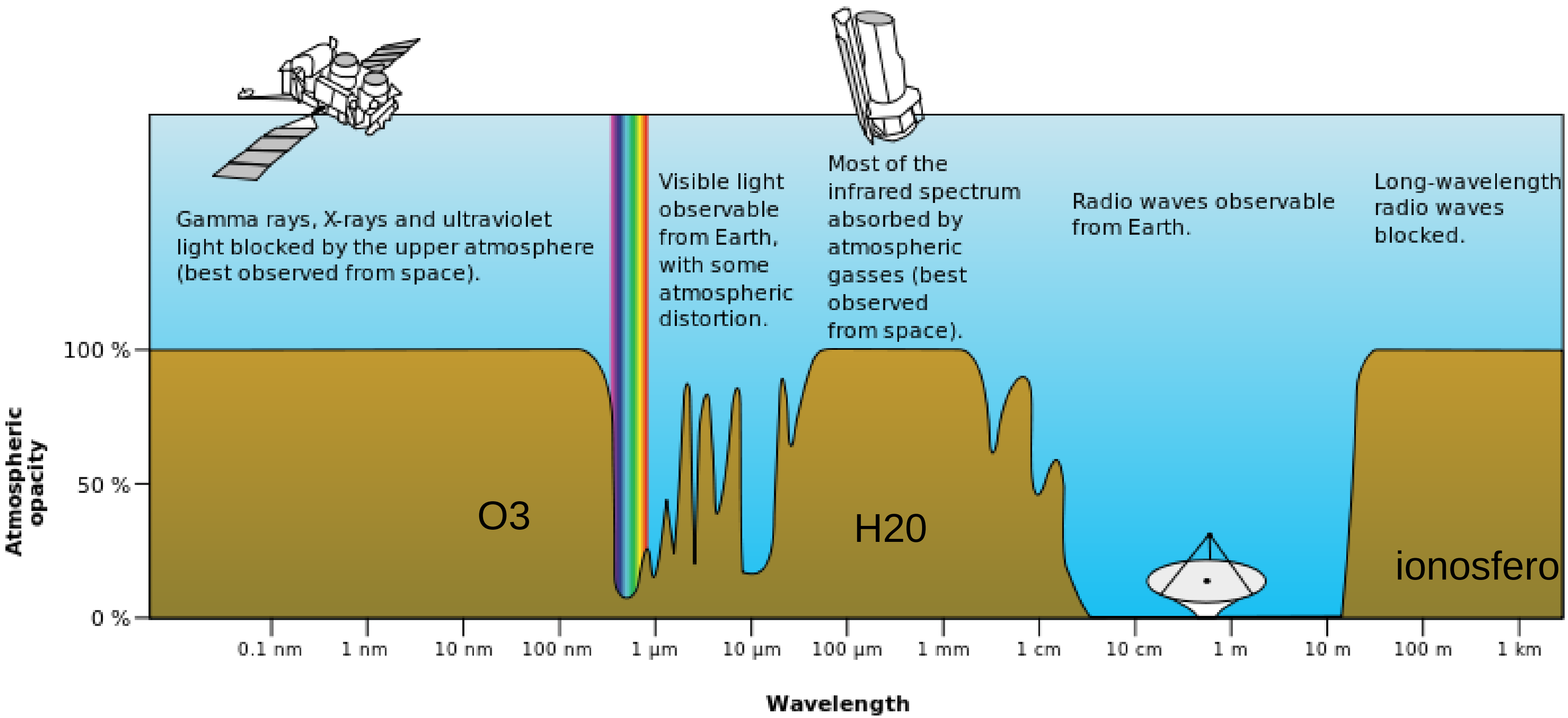
Acqua assorbe bene a 2.45 GHz (0.1 m)

Acqua,



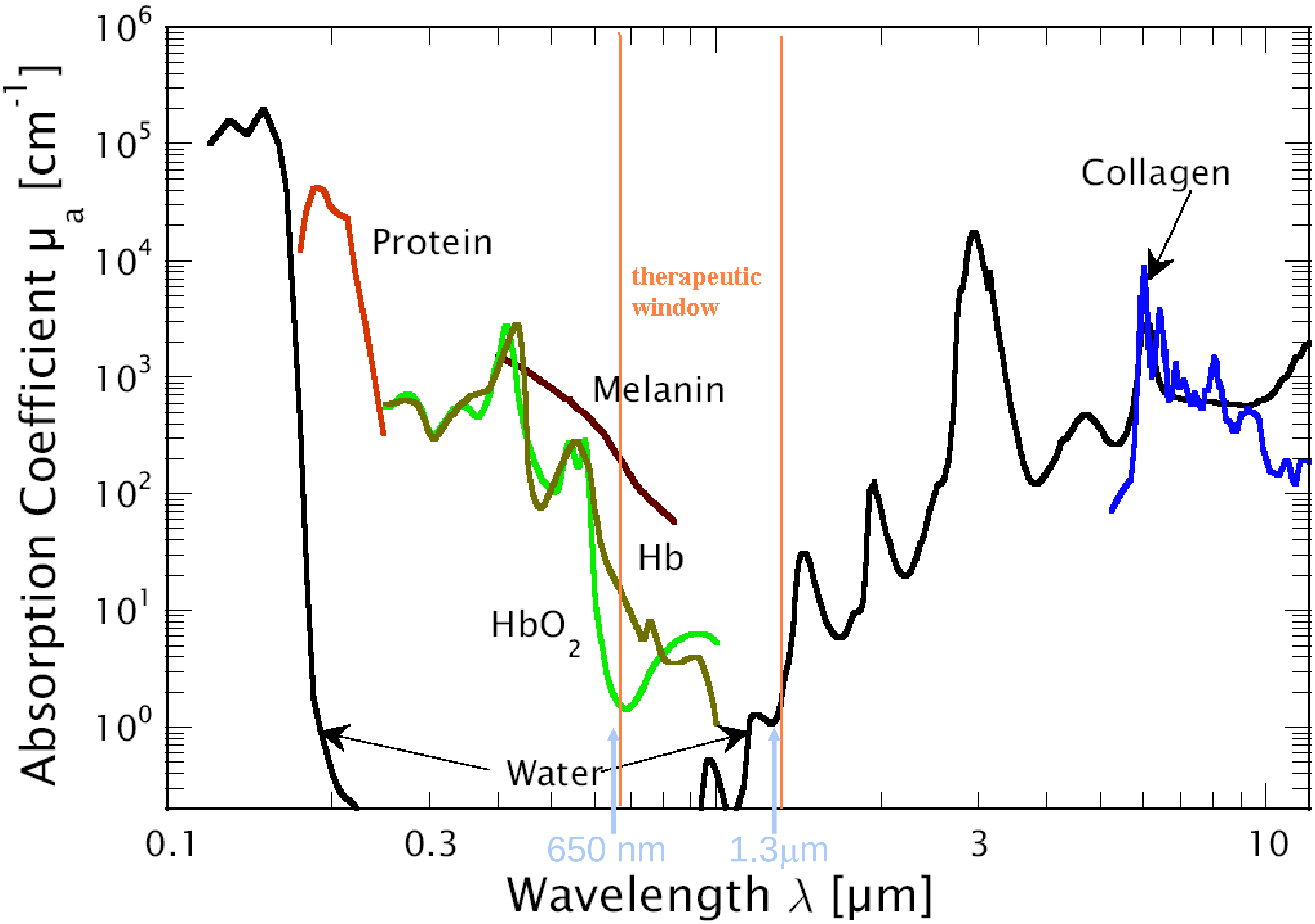
Dieci ordini di grandezza

Atomsfera

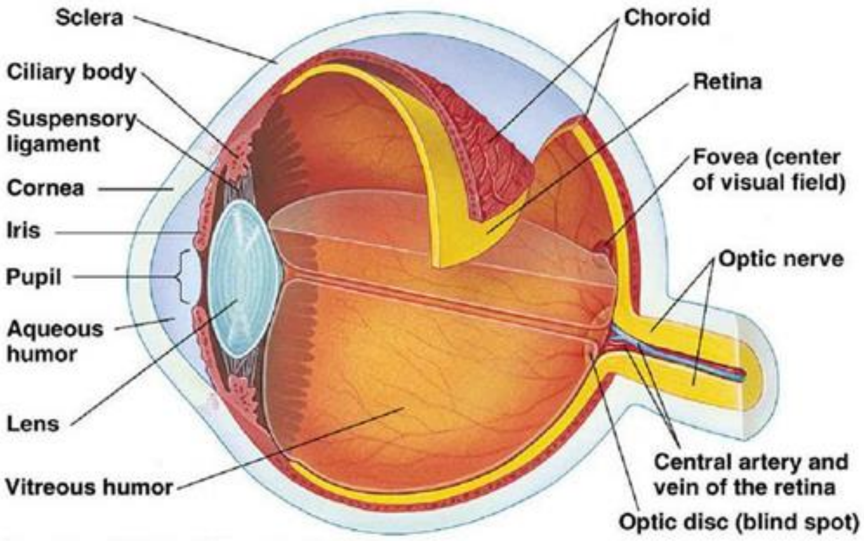


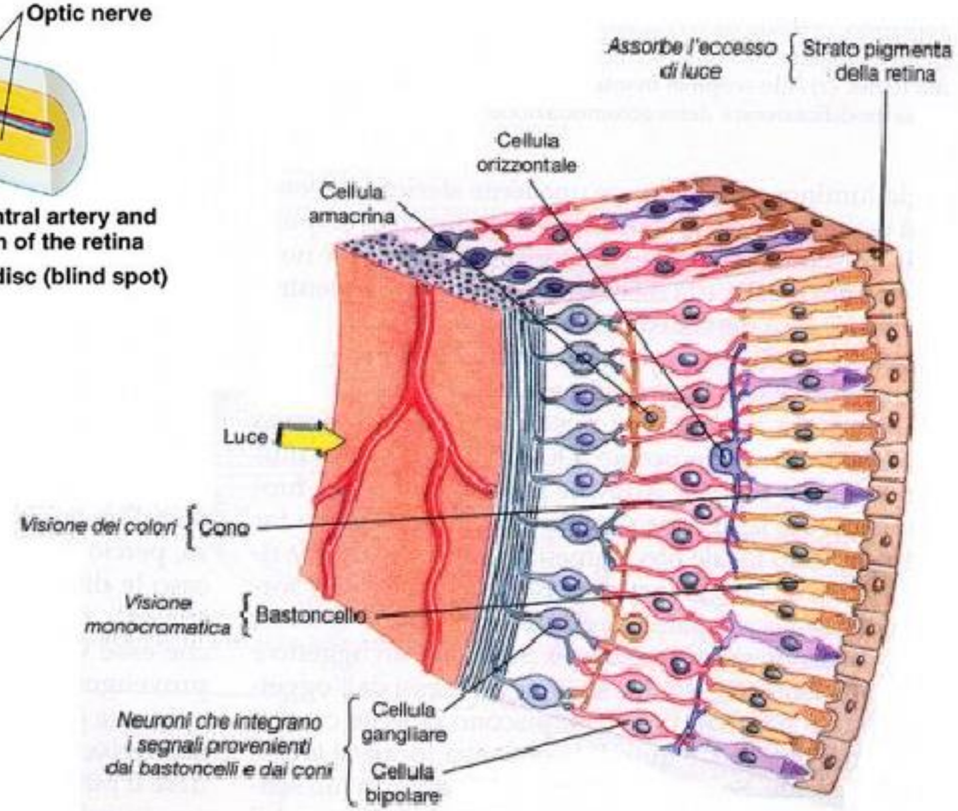
Gamma rays, X-rays and ultraviolet light blocked by the upper atmosphere (best observed from space).
Visible light observable from Earth, with some atmospheric distortion.
Most of the infrared spectrum absorbed by atmospheric gasses (best observed from space).
Radio waves observable from Earth.
Long-wavelength radio waves blocked.
100 %
50 %
0 %
Atmospheric opacity
O3
H20
ionosfero
0.1 nm
1 nm
10 nm
100 nm
1 µm
10 µm
100 µm
1 mm
1 cm
10 cm
1 m
10 m
100 m
1 km
Wavelength

Spettro di alcuni componenti biologici(ottico)

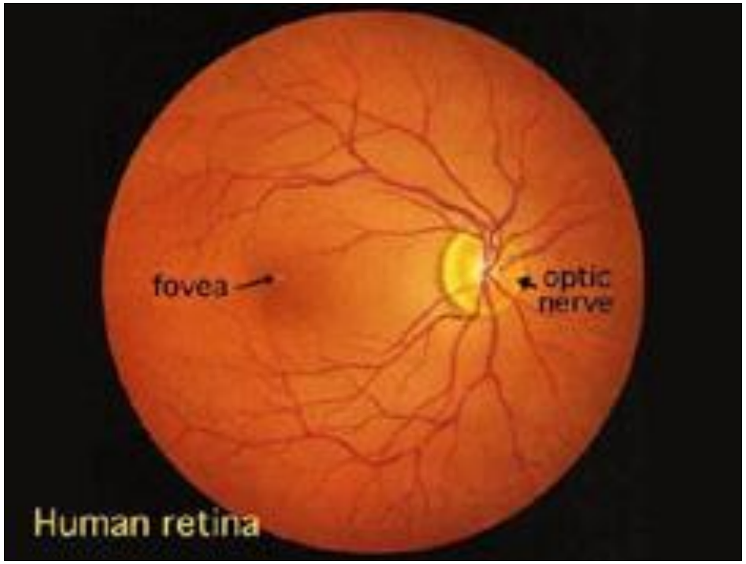


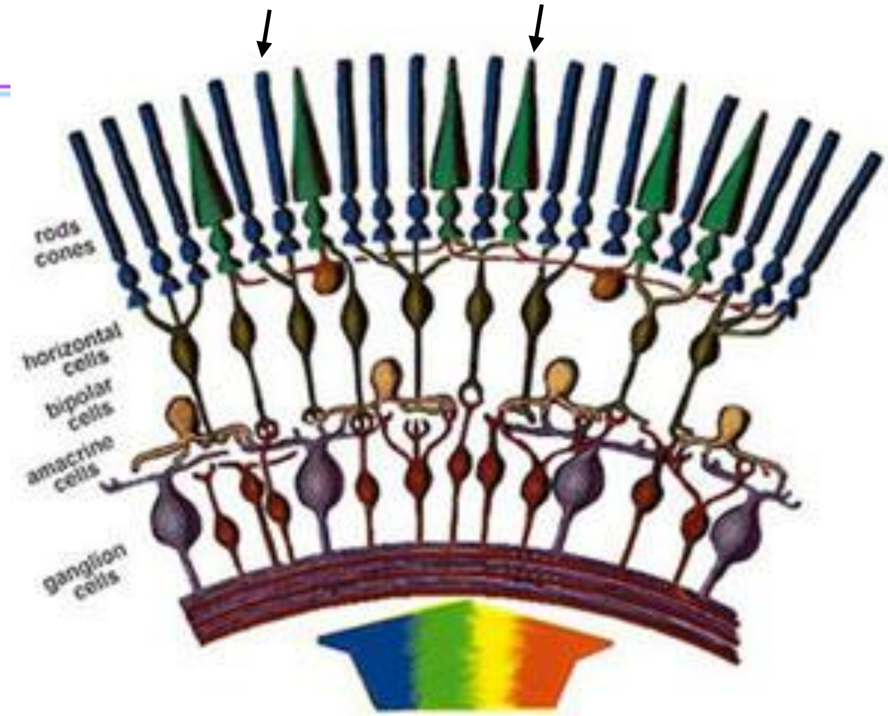
La retina


Sclera
Ciliary body
Suspensory ligament
Cornea
Iris
Pupil
Aqueous humor
Lens
Vitreous humor
Choroid
Retina
Fovea (center of visual field)
Optic nerve
Central artery and vein of the retina
Optic disc (blind spot)


Assorbe l'eccesso di luce
Strato pigmentato della retina
Cellula orizzontale
Cellula amacrina
Luce
Visione dei colori
Cono
Visione monocromatica
Bastoncello
Neuroni che integrano i segnali provenienti dai bastoncelli e dai coni
Cellula gangliare
Cellula bipolare

La retina

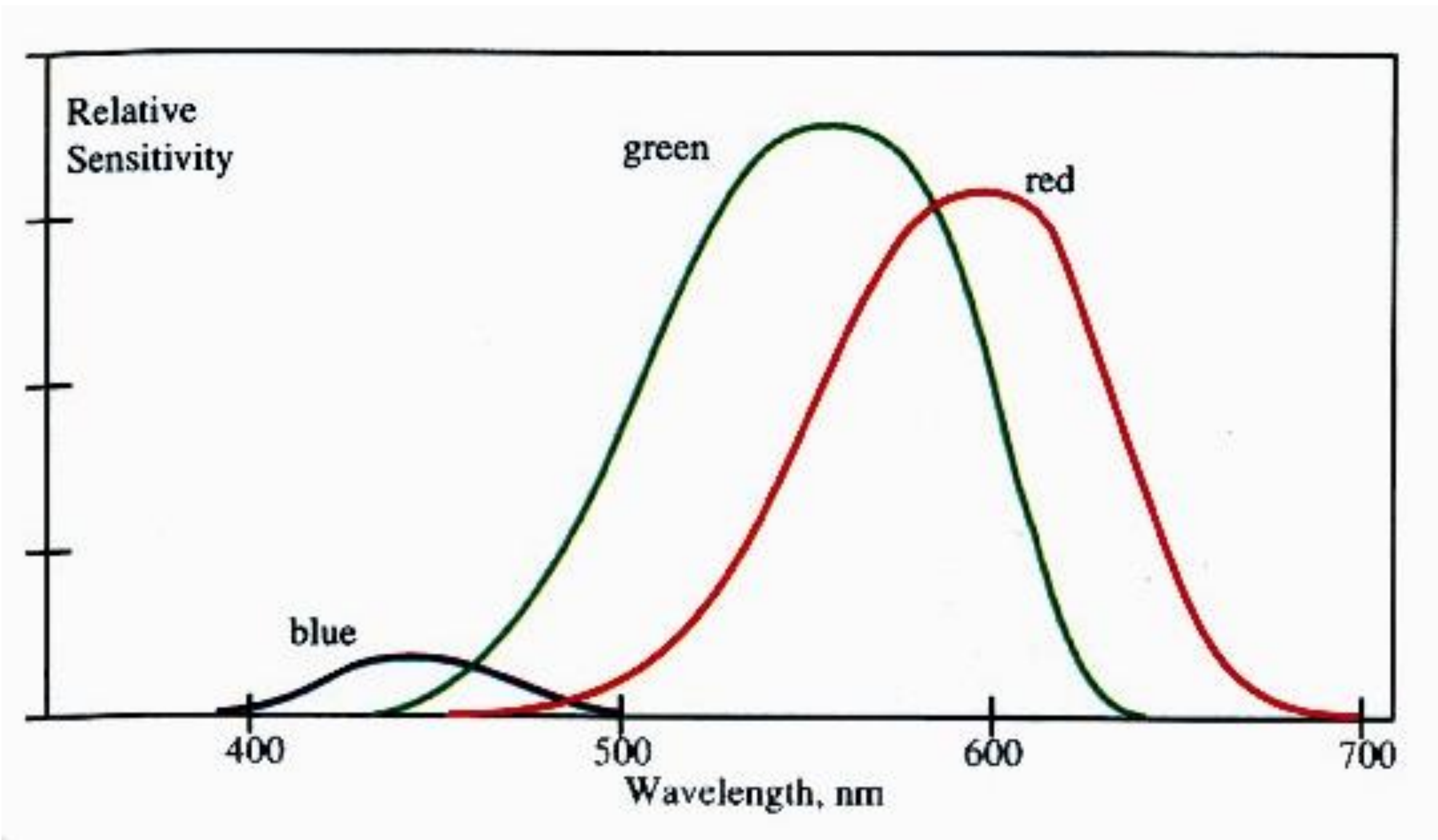




Coni concentrati nella fovea 180,000 per mm^2 . Nella altre zone predominano I bastoncelli. (approx 5,000 coni per mm^2). Nel punto cieco non ci sono fotorecettori.

I tre tipi di cono

•

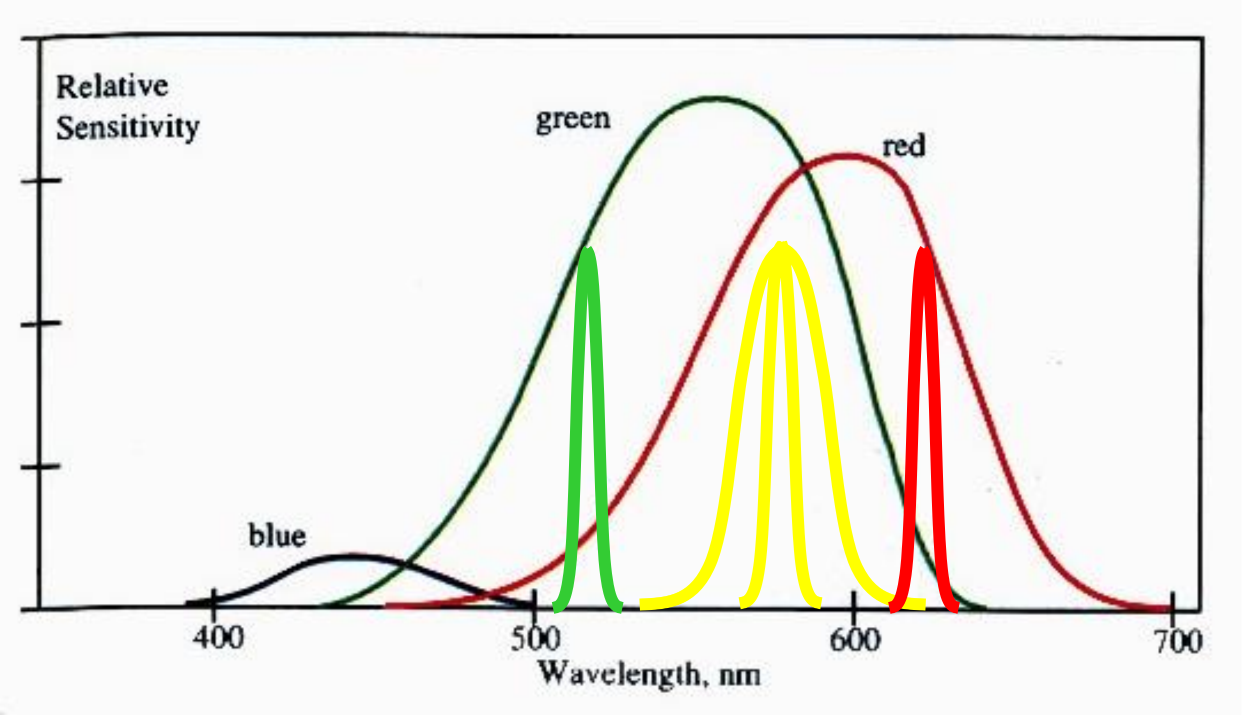


I bastoncelli non sono sensibili a colore

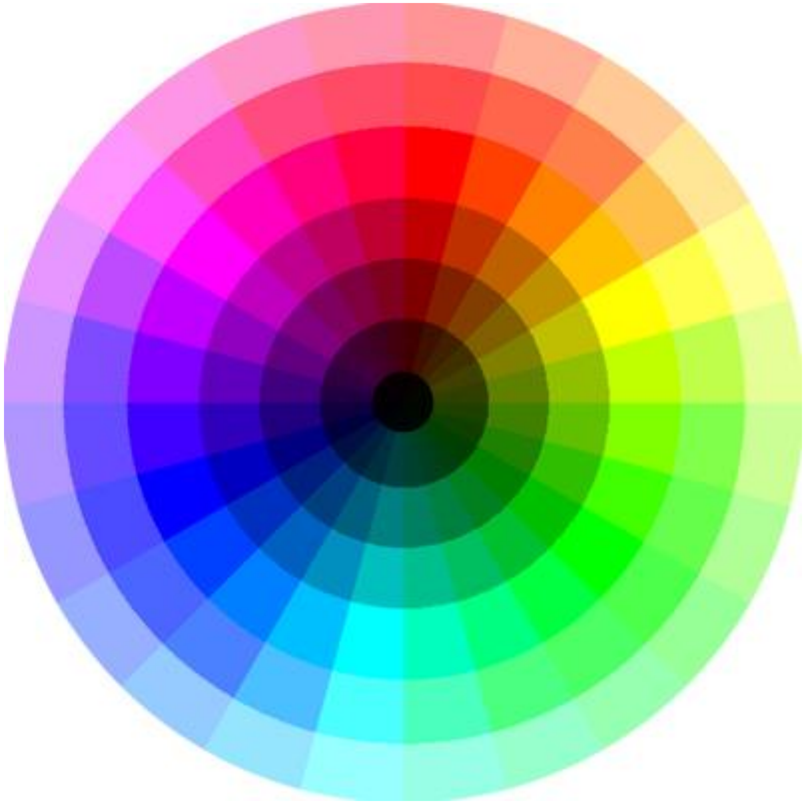
La percezione de colore.

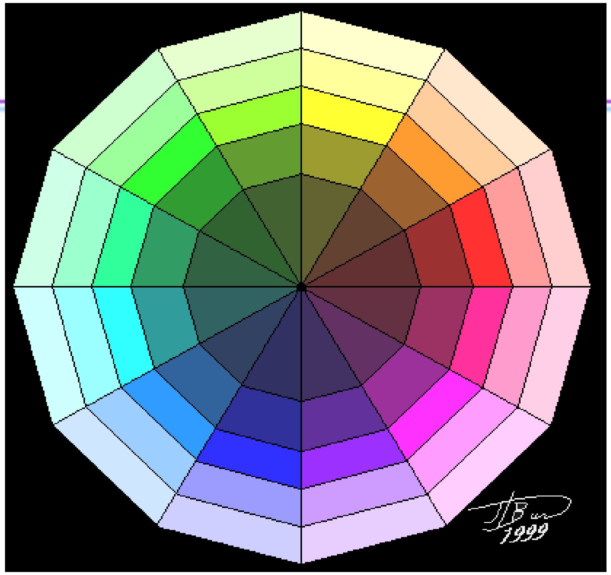
Because the eye perceives intermediate colors, such as orange and yellow, by comparing relative responses of two or more different receptors, the eye cannot distinguish between many spectra.

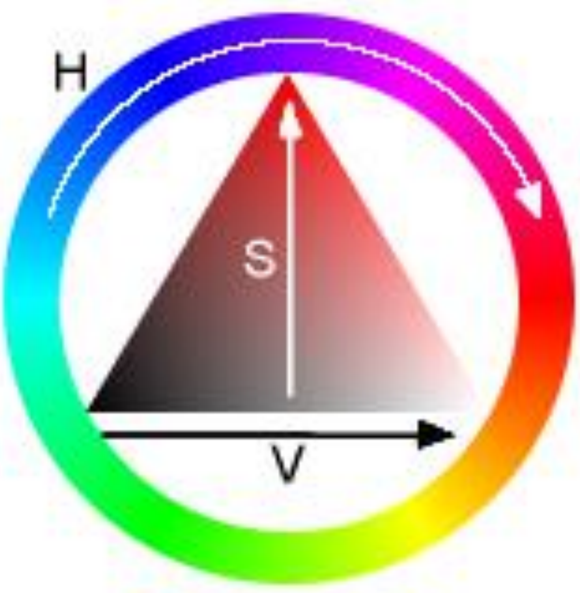
The various yellow spectra below appear the same (yellow), and the combination of red and green also looks yellow!



La teoria del colore





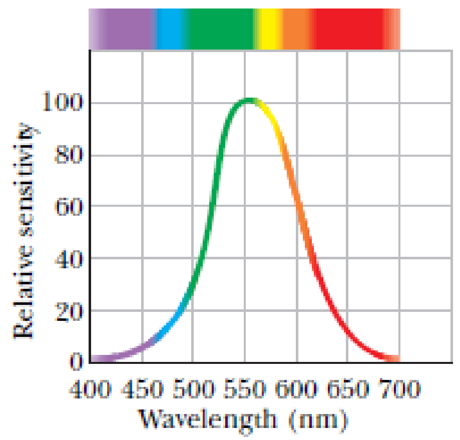


Hue = wavelength

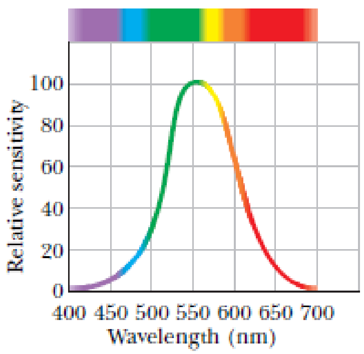
Saturation = spectral width

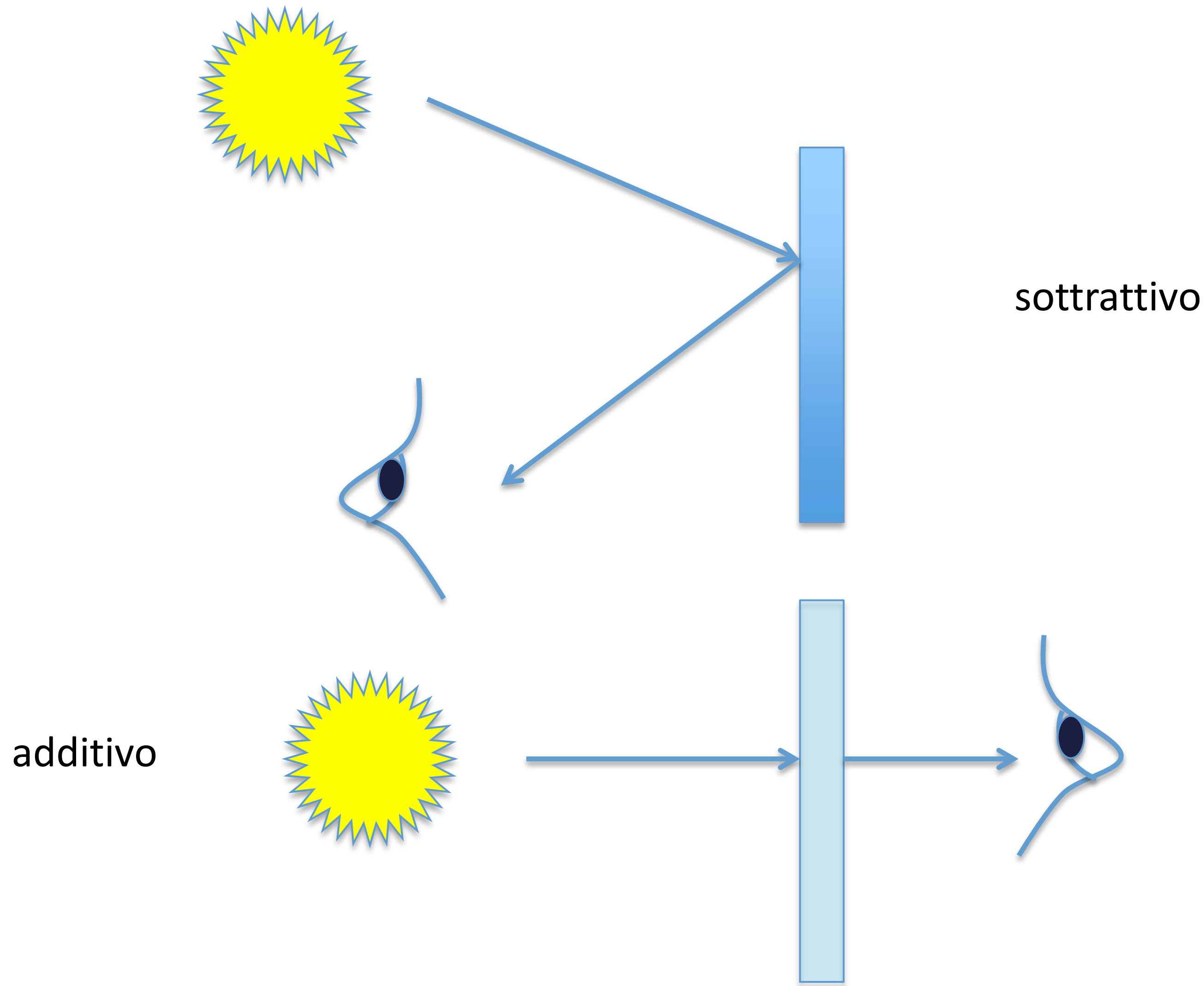
Value = brightness (intensity)

Spettro di sensibilità dell'occhio umano

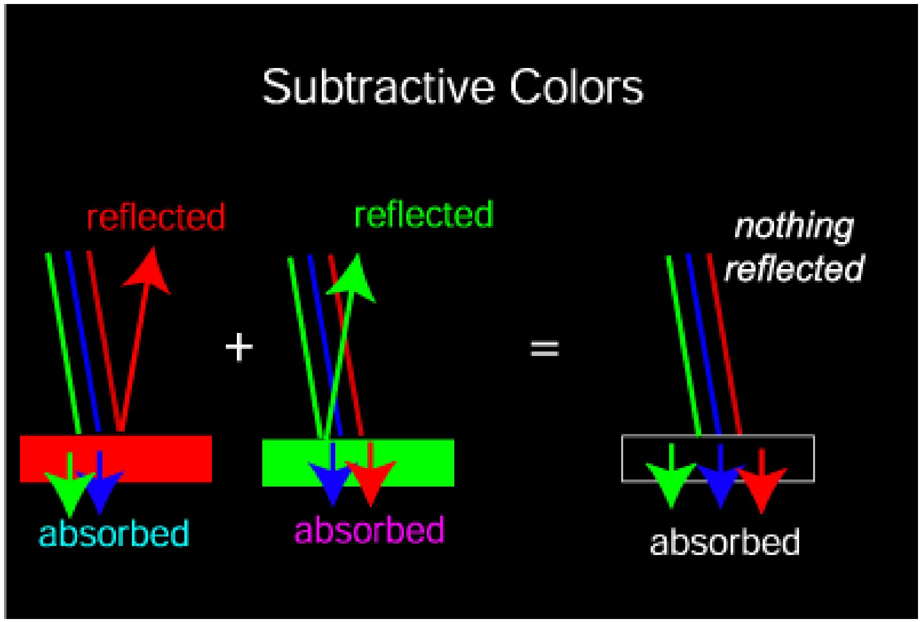


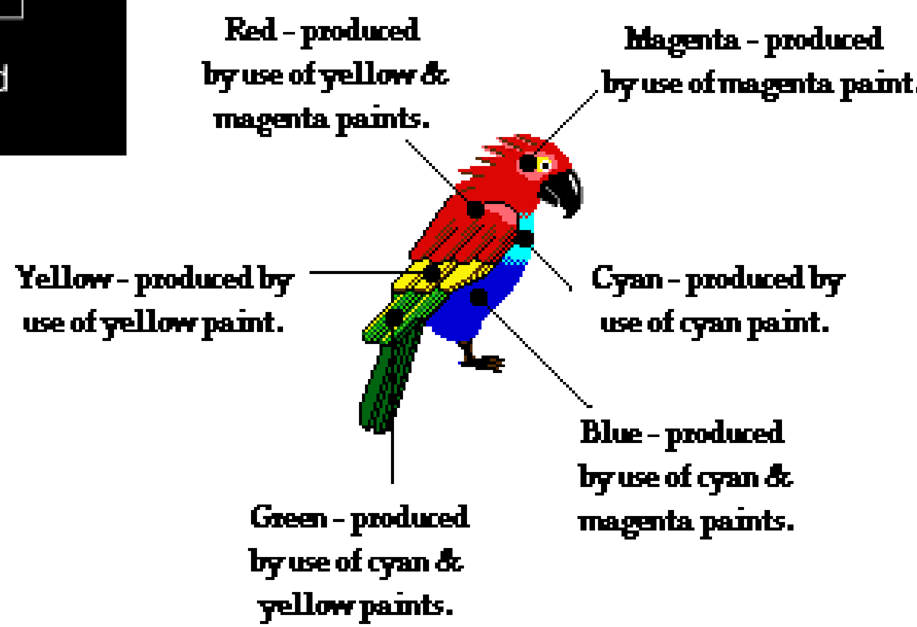
La percezione del colore



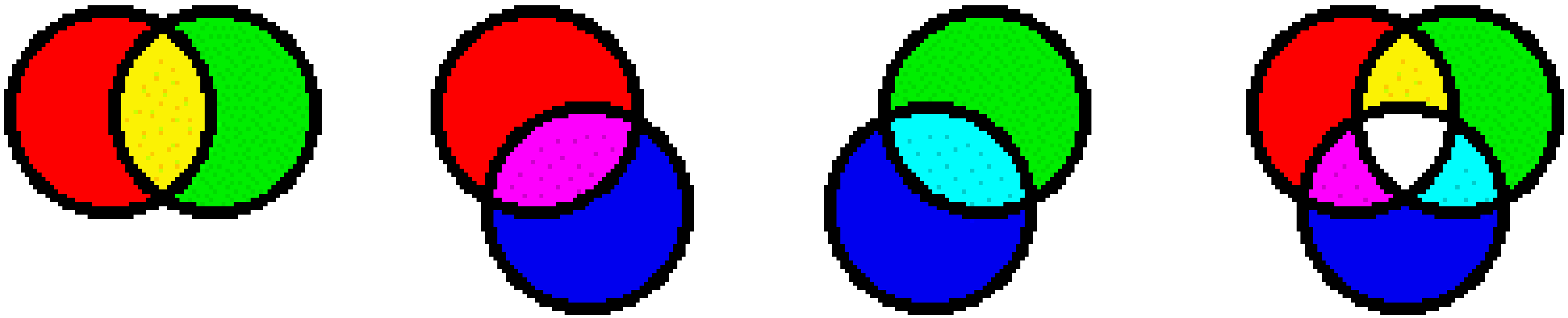


Sottrativo


Subtractive Colors
reflected
reflected
nothing reflected
+
=
absorbed
absorbed
absorbed

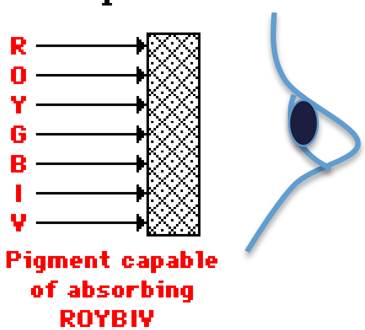

Red – produced by use of yellow & magenta paints.
Magenta – produced by use of magenta paint.
Yellow – produced by use of yellow paint.
Cyan – produced by use of cyan paint.
Blue – produced by use of cyan & magenta paints.
Green – produced by use of cyan & yellow paints.

Additivo



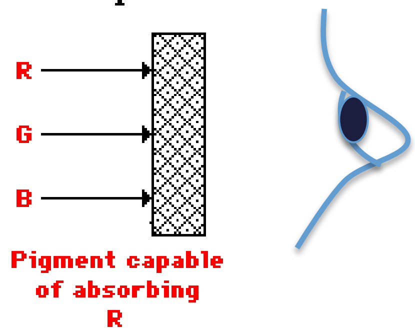
Questions

Example A



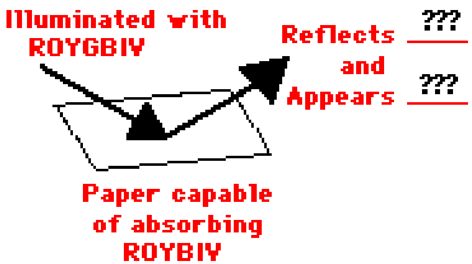
Appears ______

Example B

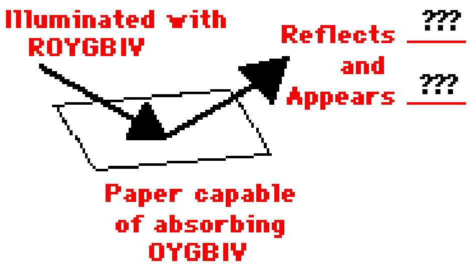


Appears ______

Example A

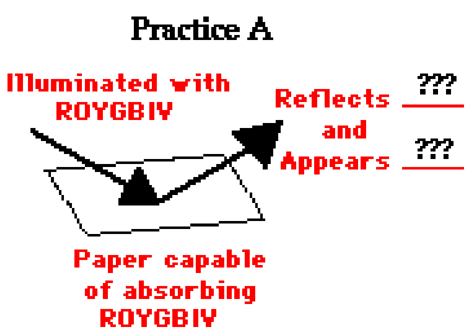


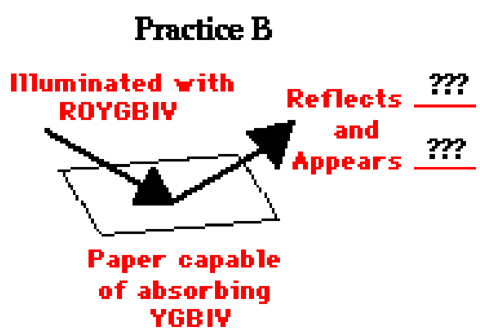
Example B



More questions

What color does a red shirt appear when the room lights are turned off and the room is entirely dark? ____________ What about a blue shirt? ____________ ... a green shirt? ____________





Refractive Index e la velocità

La velocità è λf. λ_0 diventa $\lambda = \lambda_0/n$ in un mezzo,

$$v = \lambda_0 f/(n) \Rightarrow \quad \boxed{v = c/n}$$

C è la velocità nel vuoto.

Quindi l'indice di rifrazione è il rapporto tra la vel di luce nel vuoto e quella nel mezzo

$$\boxed{n \equiv c/v}$$

E' quasi sempre > 1. In certi casi puo essere < 1, ma poi e' anche complesso- ma in questo corso non ci interessa!.

Valori di n (λ)

Table 33-1

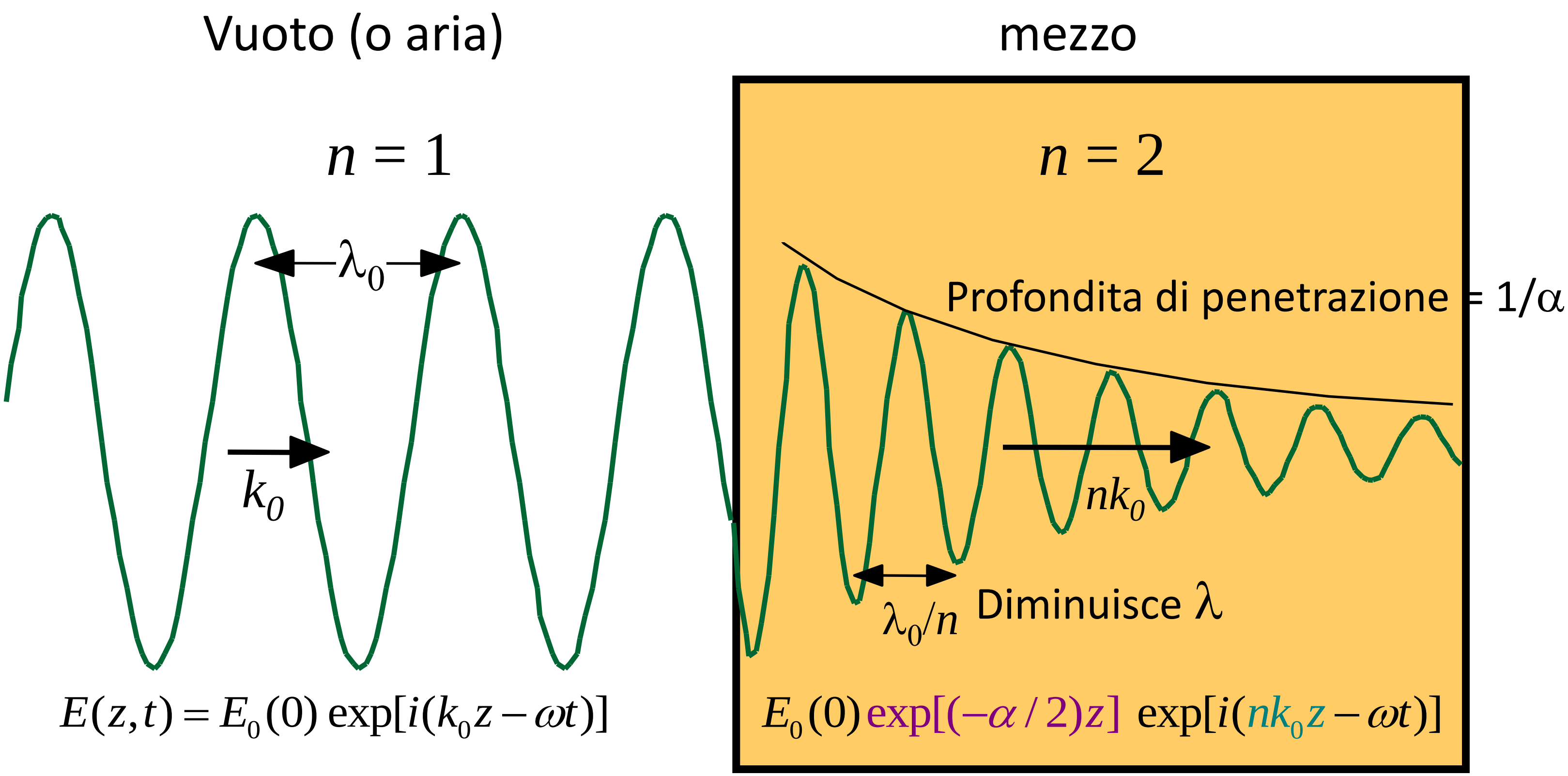
Some Indexes of Refraction[a]

Medium	Index	Medium	Index
Vacuum	Exactly 1	Typical crown glass	1.52
Air (STP)[b]	1.00029	Sodium chloride	1.54
Water (20°C)	1.33	Polystyrene	1.55
Acetone	1.36	Carbon disulfide	1.63
Ethyl alcohol	1.36	Heavy flint glass	1.65
Sugar solution (30%)	1.38	Sapphire	1.77
Fused quartz	1.46	Heaviest flint glass	1.89
Sugar solution (80%)	1.49	Diamond	2.42

[a]For a wavelength of 589 nm (yellow sodium light).

[b]STP means "standard temperature (0°C) and pressure (1 atm)."

Quando luce entra in un mezzo



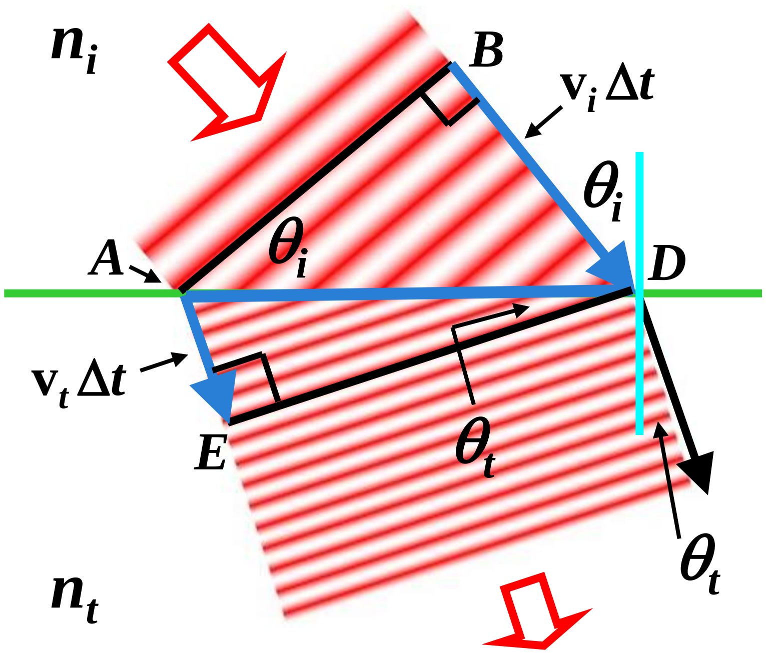
In generale, diminuisce la velocita', la lunghezza d'onda e l'ampiezza.
Rimane invariata la frequenza.

Stop here

Rifrazione e la legge di Snell

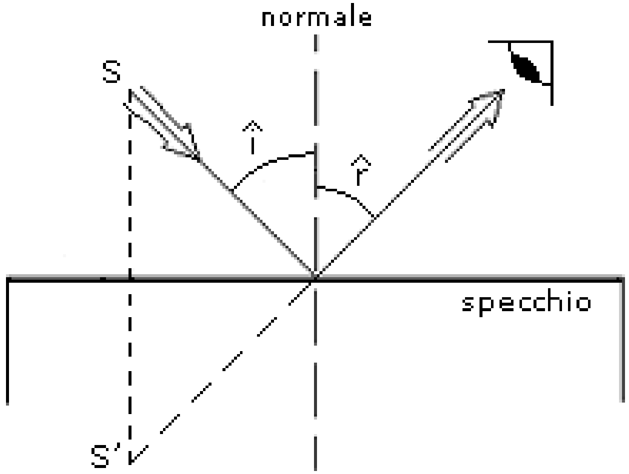
Il campo elettrico è continuo a un interfaccia tra 2 mezzi. Ma la velocità di luce è diverso. Secondo la legge di Fermat, luce prende il percorso più veloce, o il minimo camino ottico (non più corto).

:

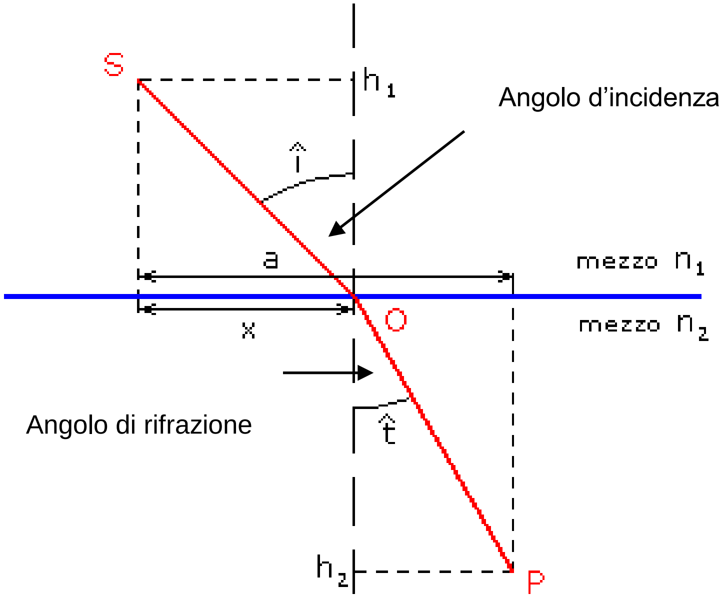


RIFLESSIONE e RIFRAZIONE

PRINCIPIO di FERMAT – *principio di tempo minimo o di minimo cammino ottico* –



Per la **RIFLESSIONE** Fermat afferma che i raggi riflessi e incidenti devono essere sullo stesso piano (il cosidetto piano di incidenza) e gli angoli devono essere uguali.



RIFRAZIONE

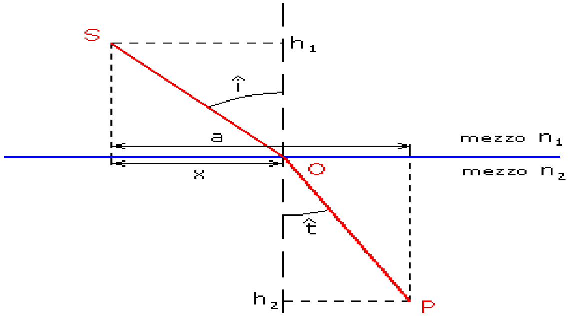
$$tempo = \frac{dist.}{vel.} = \frac{SO}{v_1} + \frac{OP}{v_2} =$$

$$= \frac{\sqrt{x^2 + h_1^{\,2}}}{v_1} + \frac{\sqrt{(a-x)^2 + h_2^{\,2}}}{v_2}$$

RIFRAZIONE (II)

Quindi $t = \dfrac{\sqrt{x^2 + h_1^{\,2}}}{v_1} + \dfrac{\sqrt{(a-x)^2 + h_2^{\,2}}}{v_2}$ e, per minimizzare t $\dfrac{dt}{dx} \to 0$

$$\frac{dt}{dx} = \frac{x}{v_1\sqrt{x^2 + h_1^{\,2}}} + \frac{-(a-x)}{v_2\sqrt{h_2^{\,2} + (a-x)^2}}$$



ma $\dfrac{x}{\sqrt{x^2 + h_1^{\,2}}} = \sin\hat{i}$ e $\dfrac{a-x}{\sqrt{h_2^{\,2} + (a-x)^2}} = \sin\hat{t}$

dunque $\dfrac{dt}{dx} = \dfrac{\sin\hat{i}}{v_1} - \dfrac{\sin\hat{t}}{v_2} \to 0$ così $\dfrac{\sin\hat{i}}{v_1} = \dfrac{\sin\hat{t}}{v_2}$

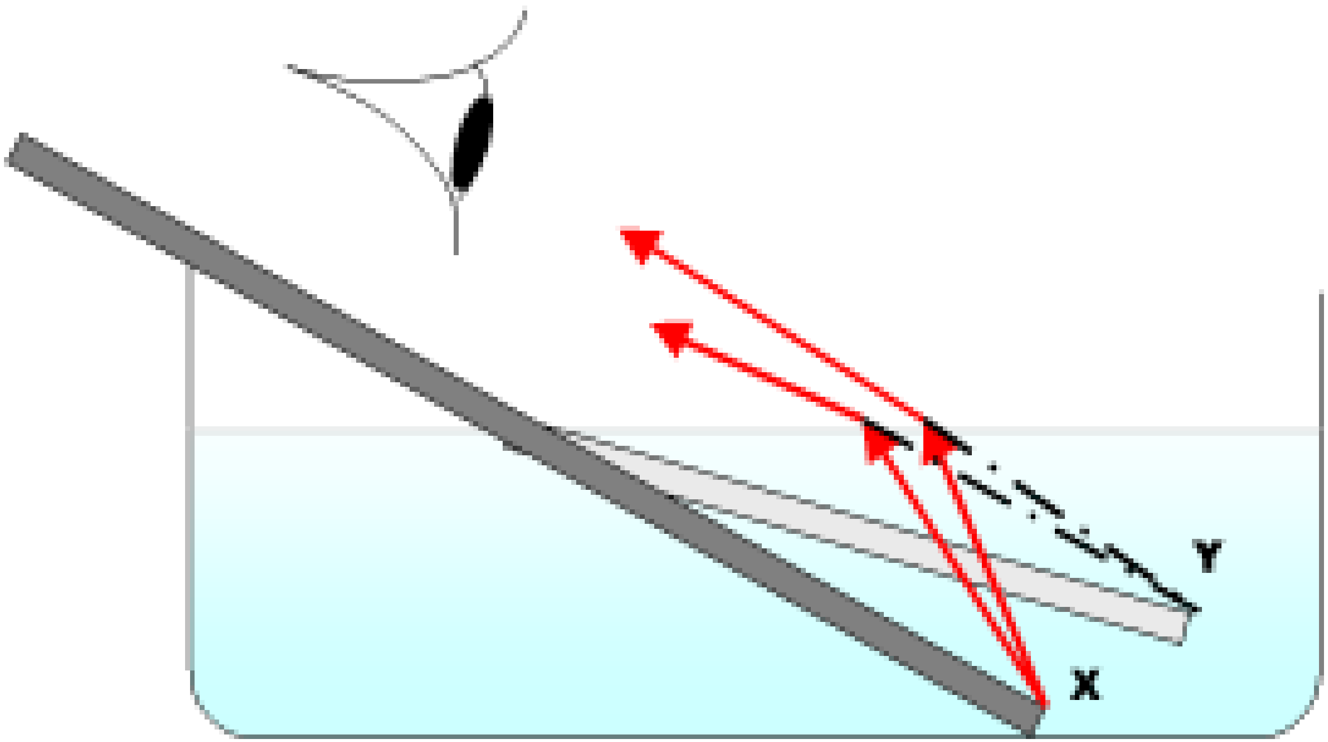
ma $n_1 = \dfrac{c_0}{v_1}$ e $n_2 = \dfrac{c_0}{v_2}$ con c_0 la velocità della luce nel vuoto

dunque $\dfrac{\sin\hat{i}}{c_0} n_1 = \dfrac{\sin\hat{t}}{c_0} n_2$ da cui la **Legge di SNELL** $n_1 \sin\hat{i} = n_2 \sin\hat{t}$

Cammino ottico = lunghezza x indice di rifrazione = l x n $\Rightarrow t_C = \dfrac{l \cdot n}{c_0}$

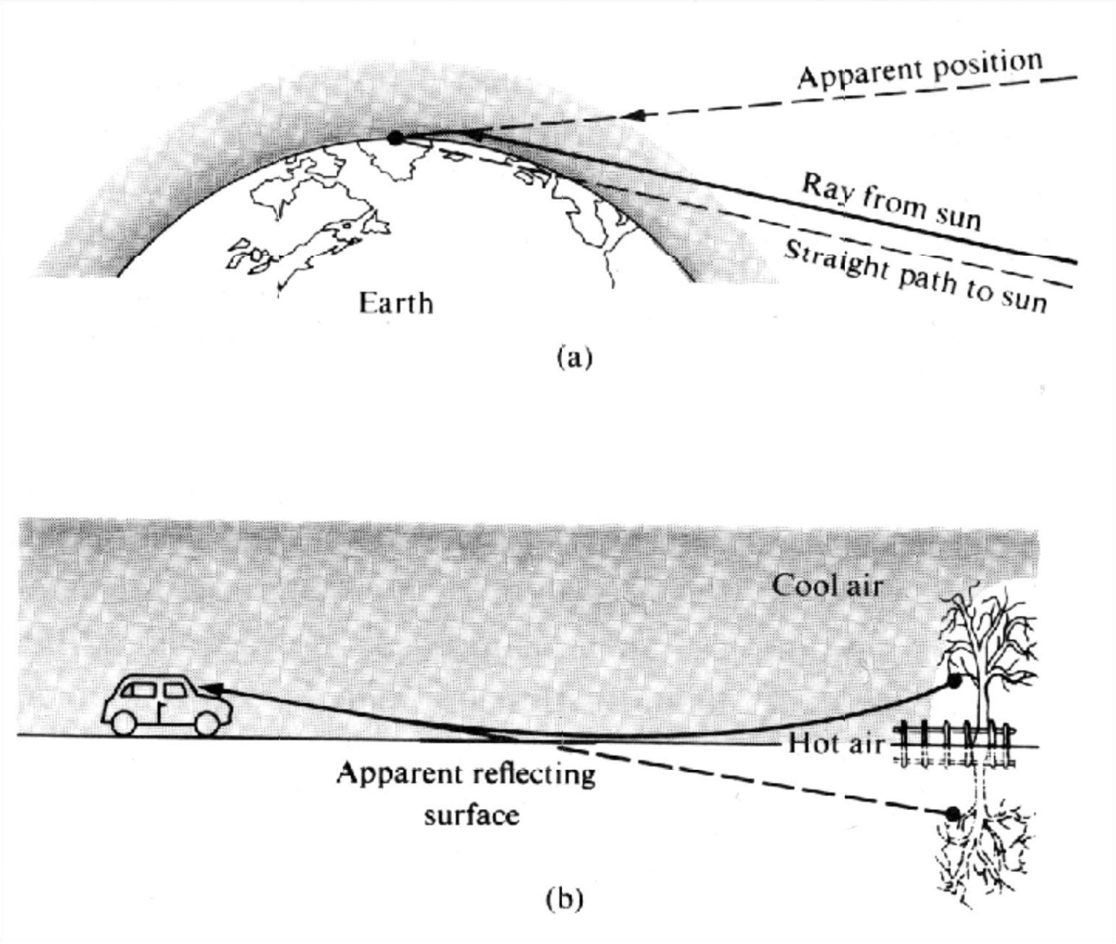
con t_C = tempo del cammino

Oggetti nell'acqua sembrano deformate.



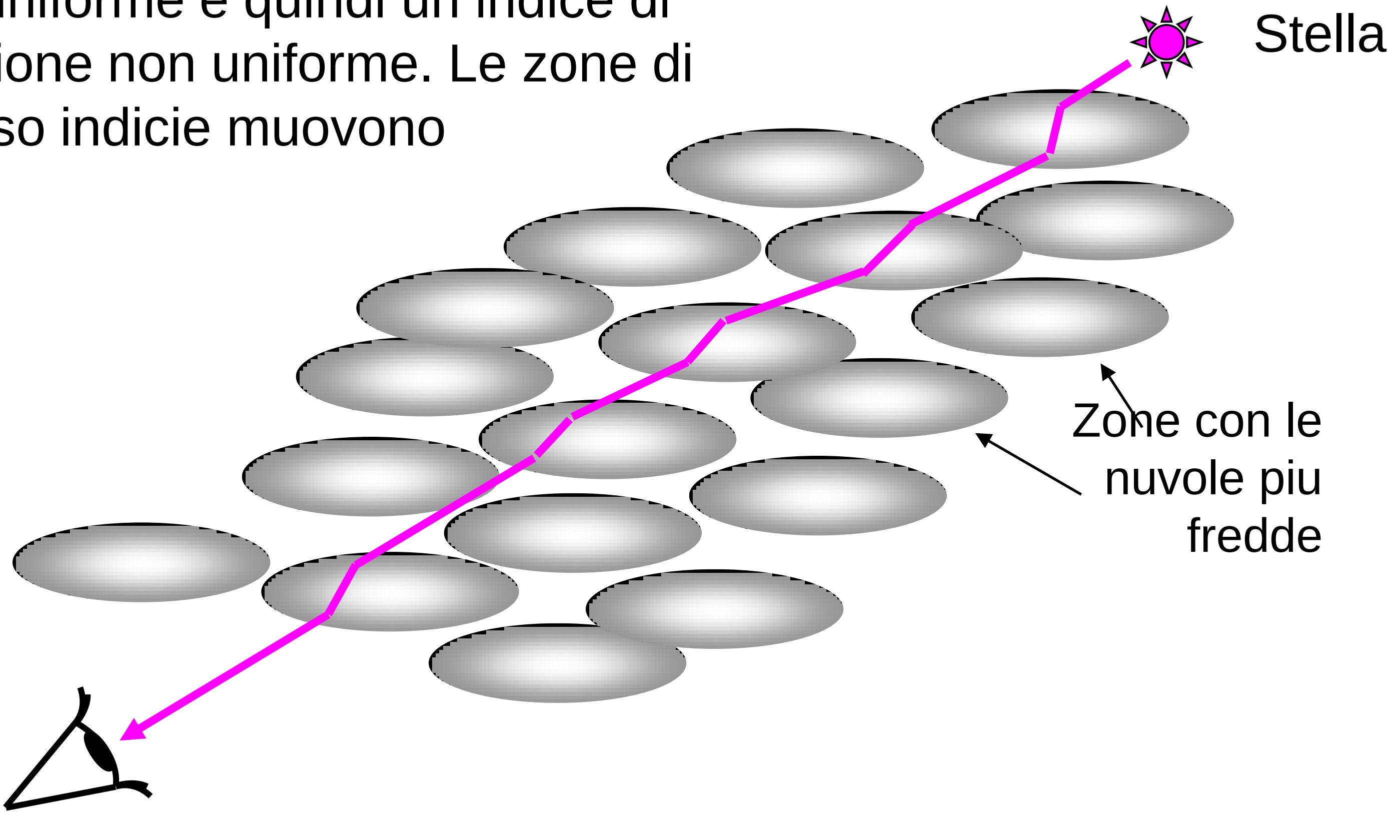
La legge di Snell spiega i miraggi,

Indice di rifrazione aumenta con la densità di aria e aumenta con la temperatura



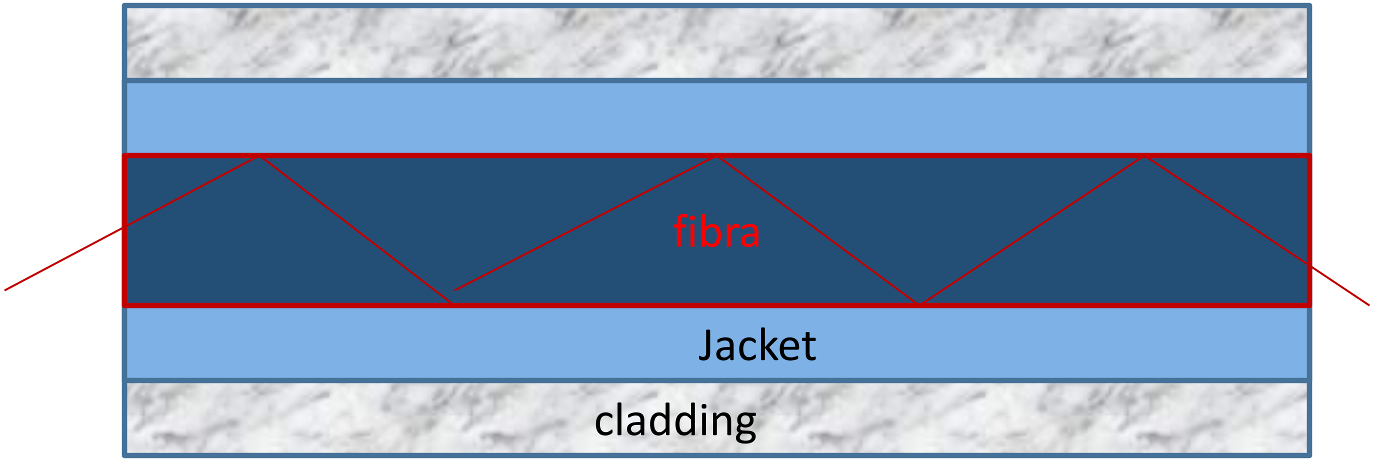
Perchè le stelle brillano.

L'atmosfera ha una temperatura non uniforme e quindi un indice di rifrazione non uniforme. Le zone di diverso indicie muovono



Quando le masse di aria si muovono, la quantità di luce che arriva ai nostri occhi varia

RIFLESSIONE TOTALE INTERNA E LA FIBRA OTTICA

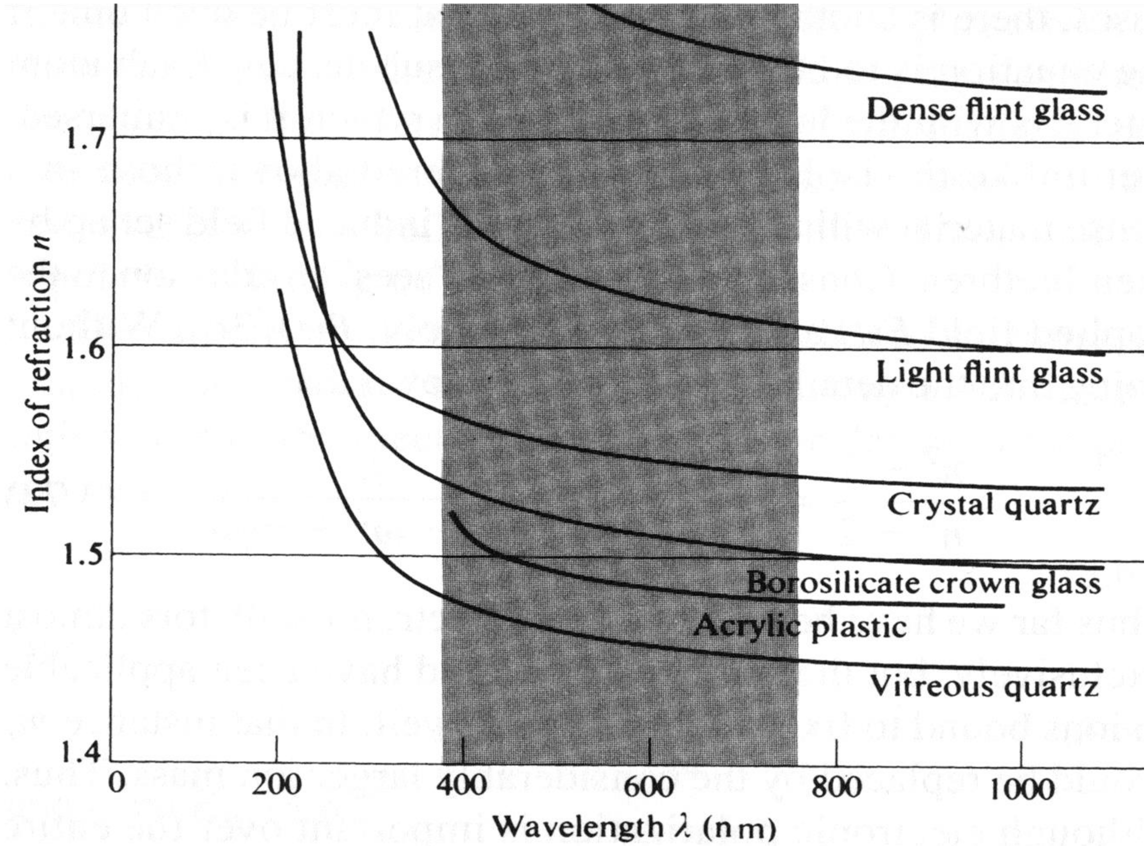


Nfibra>Njacket>Ncladding

$$\theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$$

$$n_1 > n_2$$

VETRO: DISPERSIONE

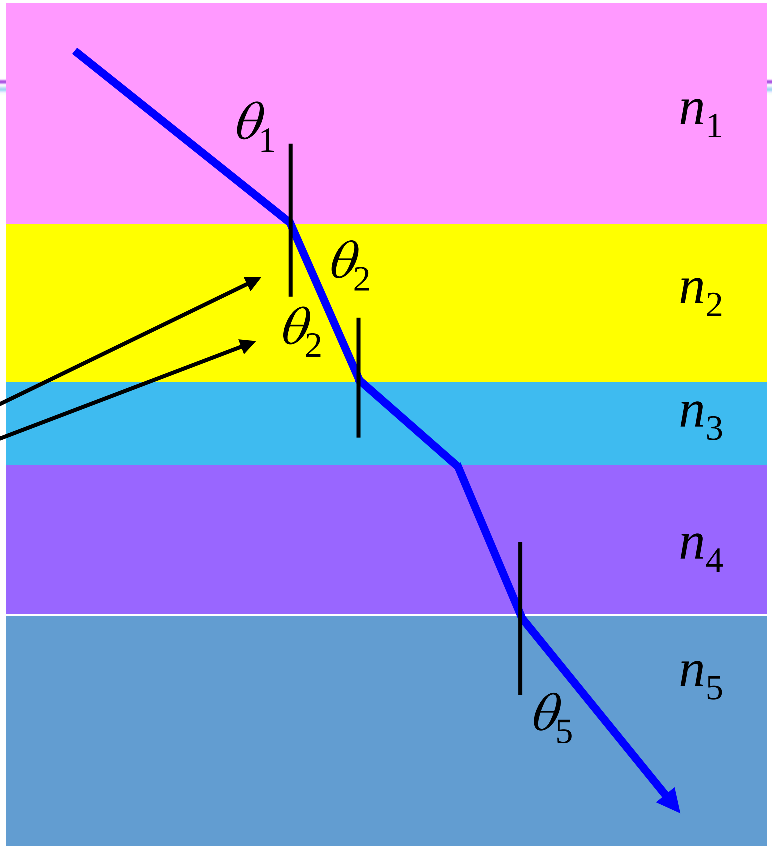


Usiamo *n* = 1.5 per il vetro, e *n* = 1.33 per acqua

Dispersione è la dipendenza di proprieta ottiche sulla frequenza. Sopratutto la dipendenza di n. Il vetro è molto dispersivo. Ci sono alcuni materiali che hanno poca dispersione. Un buon microscopio ha componenti ottici con poca dispersione.

Legge di Snell per strati paralleli

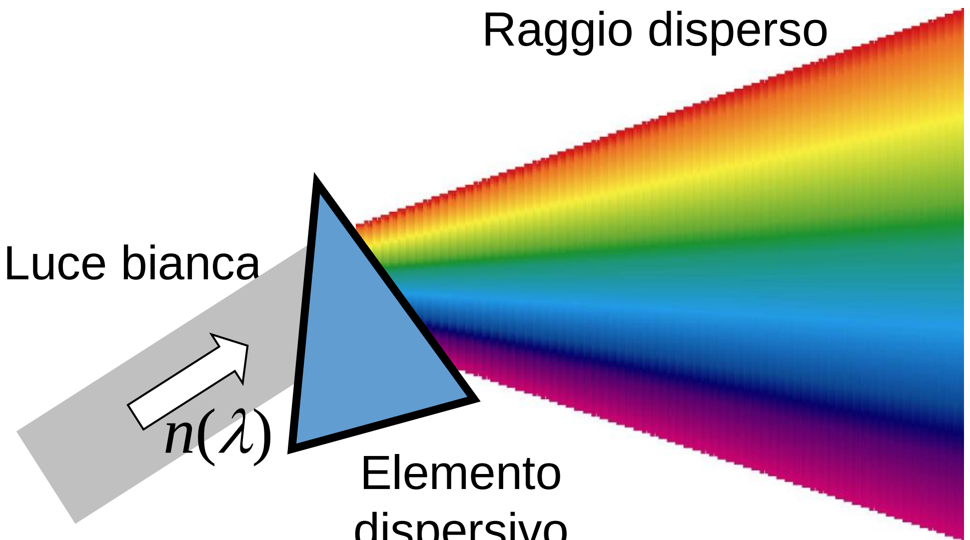
Se gli strati sono paralleli, gli angoli interni sono sempre uguali.



$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2) = n_3 \sin(\theta_3) = \ldots = n_m \sin(\theta_m)$$

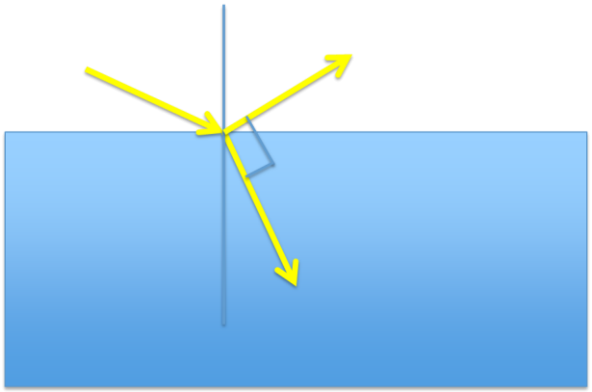
Quindi possiamo ignorare gli strati interni se interessa solo l'entrata e l'uscita!

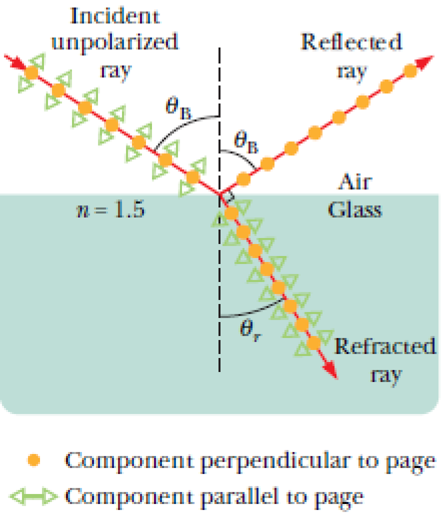
Dispersione dell'indice di rifrazione: permette al prisma di separare luce bianca



Dispersione puo essere buono (monocromatore) o problematico (microscopio)

Angolo di Brewster





Succede quando $\theta_r + \theta_B = 90$. In questo caso la luce riflessa ha solo componenti polarizzati perpendicolare al piano di incidenza.

Gli specchi e le lenti

Imagine virtuale: quello nello specchio, un miragine. E' un imagine percepita.

Imgagine reale: è una che può essere proietta.

Noi siamo in grado di vedere entrambi grazie alla struttura dell'occhio.

Questions

Cos'è la luce?

Come viene generato?

Come viene rivelato?

(no light, no matter- no matter, no light)

Show that

$\theta_B = \tan^{-1}(n)$

•4 About how far apart must you hold your hands for them to be separated by 1.0 nano-light-second (the distance light travels in 1.0 ns)?