

Instituto de Ingenieros Civiles.

APLICACIONES DE LA LUZ ULTRAVIOLETA

á la investigación
micrográfica.

CONFERENCIA

PRONUNCIADA POR EL INGENIERO

== == == DE MINAS == == ==

D. DOMINGO DE ORUETA

: : : : 18 DE FEBRERO DE 1914 : : : :

APLICACIONES

de la luz ultravioleta á la investigación micrográfica.

INSTITUTO DE INGENIEROS CIVILES

APLICACIONES DE LA LUZ ULTRAVIOLETA

á la investigación micrográfica

CONFERENCIA

PRONUNCIADA POR EL INGENIERO DE MINAS

DON DOMINGO DE ORUETA

18 de Febrero de 1914.



MADRID

IMPRESA DE PRUDENCIO PÉREZ DE VELASCO

Calle de Campomanes, núm. 4.

1914

Señores:

Ante todo, mi más cariñoso saludo á todos, y las más expresivas gracias á la Junta directiva de esta Asociación, que me proporciona el placer de dirigiros la palabra desde este sitio.

No pretendo daros una conferencia, me limitaré sencillamente á tener con vosotros una conversación amistosa, porque entre amigos me veo, diciendo algo de este método de investigación tan moderno que se llama la aplicación de la luz ultravioleta al microscopio, que va tomando de día en día mayor incremento, que también tiene aplicaciones en nuestra profesión, y quizá en este sentido lo que diga pueda ser de algún interés.

Empezaré por reseñar brevemente las propiedades de la luz ultravioleta; después veremos el partido que de estas propiedades se saca para la investigación microscópica, y al mismo tiempo, y como final, mostraremos, por medio de proyecciones, algunos de los resultados prácticos á que se ha llegado.

Sabido es que, á partir del extremo más refrangible del espectro visible, á partir del extremo violeta, vienen radiaciones que no se sabe hasta dónde llegan: radiaciones invisibles, que por la posición que ocupan respecto del espectro se han llamado radiaciones ultravioletas ó espectro ultravioleta. La característica física de estas radiaciones es la misma que la de cualquiera luz: el número de vibraciones

que da por segundo la molécula de éter que las origina; pero como este número de vibraciones se cuenta por trillones por segundo y estas cifras la imaginación las concibe mal, se ha tratado de buscar y se ha encontrado una medida más asequible: la que se llama longitud de onda, que es la relación entre estos trillones de vibraciones por segundo y la velocidad de propagación de la luz, factor ya conocido y que se mide con bastante exactitud.

Ya esta medida, longitud de onda, puede expresarse en micras, que es la unidad de medida en óptica, la milésima de milímetro, y esto nos permite definir el espectro ultravioleta. El espectro ultravioleta comienza, como dije antes, en el extremo del espectro visible, en un punto en donde la longitud de onda de la radiación viene á ser alrededor de 0,40 de micra.

No se sabe hasta dónde se extiende, pero se ha podido estudiar hasta una longitud de onda de 0,10 ó 0,12 de micra. Pronto veremos por qué no se ha podido pasar de ahí. Es un grupo, pues, de radiaciones caracterizadas ópticamente por ser siempre de onda menor que la menor del espectro visible é ir esta onda progresivamente decreciendo, como también sucede con el espectro visible. A éstas, por ser de onda más corta que las del espectro visible, se les suele llamar también radiaciones de onda corta.

Esta luz ultravioleta tiene propiedades bastante curiosas, algunas de ellas distintas de las de la luz visible. No voy á enumerarlas todas porque esto me llevaría muy lejos; pero sí voy á decir someramente cuáles son aquellas que tienen directa aplicación al microscopio. La primera de ellas queda ya dicha, es precisamente la característica óptica de la radiación, su corta longitud de onda. Luego veremos cómo se aprovecha esta corta longitud de onda en el microscopio. La segunda propiedad es la enorme facilidad con que estas radiaciones son absorbidas por los cuerpos que atraviesan. Tan enorme es esta facilidad, que cuerpos que se citan como modelo de transparencia para luz visible, por ejemplo, el vidrio resulta totalmente ó casi totalmente opaco

para estas radiaciones; una lámina de 3 á 6 milímetros, de vidrio, basta para detenerlas todas, para obrar con ellas como si fuera una pantalla opaca. El agua, que es muy transparente al espectro visible, lo es también en parte al ultravioleta; pero á partir de la radiación 0,20 ó 0,22 de micra, ya obra como cuerpo opaco, sobre todo para las que siguen en el sentido decreciente de la onda.

El aire es, quizá, el cuerpo que se usa en Microscopía, digámoslo así, más transparente para radiaciones ultravioletas, y, sin embargo, empieza ya á ser opaco, y muy opaco, para las que miden menos de 0,15 de micra de longitud de onda, y por eso no se ha podido estudiar más que hasta la radiación 0,10 ó 0,12 del espectro del hidrógeno y del cinc, porque ha sido preciso para estudiarlo operar en el vacío, con todos los inconvenientes que esta técnica trae consigo.

¿Qué ley sigue esta absorción? No se sabe todavía. Cuando se pone una persona á estudiar por primera vez el espectro ultravioleta, á primera vista parece que la ley es muy sencilla, que la absorción va siendo tanto mayor cuanto más corta es la longitud de onda; pero luego, profundizando más, se advierte que no es así, y se ve que en algunos cuerpos, por lo menos, existe en el espectro ultravioleta lo que se llama una banda de absorción, es decir, una zona dentro de cuyo grupo de radiaciones el cuerpo en cuestión es totalmente opaco; pero si se emplean radiaciones de onda un poquito más largas que las primeras de la banda, ó más cortas que las últimas, esas radiaciones atraviesan parcialmente al cuerpo en cuestión. Esto se ha podido comprobar fácilmente con las sales de plata y con algún otro cuerpo quizás. Claro es que lo hecho no basta para sentar una ley; mas sí para decir que la cosa no es tan sencilla, tan elemental como parece á primera vista.

Lo que sí se puede afirmar, porque salta á la vista en cuanto se empieza á estudiar la luz ultravioleta, es la extraordinaria sensibilidad de la absorción. Si, por ejemplo, tenemos una mezcla de dos cuerpos, el uno más opaco que el otro á la luz ultravioleta, esa mezcla dejará pasar cierta can-

tividad de esta luz. Por poco que cambiemos las proporciones de la mezcla, aunque sea en una cantidad insignificante, esta diferencia se traduce en un aumento muy sensible de la transparencia, si lo que hemos hecho ha sido añadir á la mezcla cuerpo transparente, y de la opacidad, si lo que hemos hecho ha sido añadir cuerpo opaco. Esta es una propiedad que tiene grande aplicación hoy día en las investigaciones microscópicas.

Hay otras que todos conocéis: esa acción que ejerce sobre los organismos, de la que se ha sacado partido para esterilizar las aguas potables y algún otro producto, aplicación que hoy está bastante generalizada en higiene pública. Hay también esa acción catalítica que ejerce sobre algunos compuestos químicos y que es de aplicación, aunque indirecta, en las investigaciones microscópicas. Tiene además otras propiedades que no enumero por la razón que antes di. Indicadas así rápidamente las principales propiedades, vamos á ver cómo se saca partido de ellas en Microscopía.

Para esto hay que citar un hecho que ejerce un influjo muy grande en toda la óptica moderna: me refiero á la publicación de la famosa teoría de Abbe, teoría que apareció por primera vez en el año 1873 y que produjo verdadera revolución en todo lo que se sabía sobre formación de imágenes á través de lentes, no sólo de las lentes del microscopio, sino también de los objetivos fotográficos, astronómicos, terrestres, etc., y en general de todos aquellos instrumentos en que la luz trabaja por refracción. Esta teoría se discutió poco, porque venía apoyada en argumentos profundamente científicos; tomó carta de naturaleza en la Ciencia, y á partir de entonces todos los instrumentos de óptica de la categoría que he dicho se hicieron con arreglo á estas deducciones del famoso Carlos Ernesto Abbe, de la Universidad de Jena.

Ahora, para ser lógico, debería yo hacer una exposición aunque fuera sucinta de la teoría de Abbe; pero no hay tiempo para ello, me llevaría más del que puedo dedicar á esta conversación, y además no es absolutamente necesario,

puede prescindirse de ello porque si alguno de mis oyentes tuviese interés en estudiar la teoría de Abbe, precisamente tiene en español la mejor fuente para conocerla en los dos libros del eminentísimo profesor español D. Joaquín María de Castellarnau, actual Presidente del Cuerpo de Ingenieros de Montes. No digo esto por darme el gusto de prodigar una alabanza á mi querido maestro y amigo; lo digo repitiendo las palabras del autor de la teoría, del profesor Carlos Ernesto Abbe, que hace muchos años, contestando á una carta mía en que le rogaba me enviase el texto ó indicación bibliográfica en que pudiera estudiar á fondo su teoría, me mandó una lista de libros, y me dijo: "En ninguno encontrará usted una exposición tan clara, tan exacta, tan justa de la teoría mía y de mi modo de pensar, como en un libro escrito precisamente en español y por un compatriota de usted,." Y me señaló el libro de mi buen amigo don Joaquín María de Castellarnau, publicado el año 85, sobre la *visión microscópica*. Hay, pues, medios sobrados de conocer esta teoría, si alguno tiene interés en ello. Ahora voy á limitarme á poner en el encerado una de las fórmulas finales de ella, que es la que nos interesa para este caso. Esta fórmula es

$$R = \frac{n \operatorname{sen} B}{\lambda}$$

Esta es una de las fórmulas más importantes en lo que se refiere á Microscopía, y está deducida fundándose en leyes ópticas perfectamente comprobadas; se demuestra matemáticamente; pero tiene además una demostración que vale más, y es la de que desde hace cuarenta años se basa en ella la construcción de aparatos microscópicos, con completo éxito. En fin, yo os ruego que me creáis bajo mi palabra de honor al afirmaros que la fórmula es verdadera y que me ahorréis el trabajo de demostrarla matemáticamente. Y en este supuesto, vamos á analizarla.

R es el *poder resolvente* del objetivo del microscopio, y digo del objetivo, porque aunque integran el microscopio

dos elementos, objetivo y ocular, sabido es que el ocular no tiene más misión que la de ampliar la imagen objetiva, que no añade ni un solo detalle á esta imagen, ni la modifica en nada.

Por lo tanto, todo lo que vemos por el microscopio es debido al objetivo; la imagen microscópica la forma el objetivo directamente del objeto. R es el poder resolvente del objetivo, y se llama poder resolvente de un objetivo el grado en que dicha lente tiene la facultad de llevar á la imagen los detalles pequeños del objeto. Esto no se entiende muy claramente. Vamos á poner un ejemplo. Supongamos un objetivo cuyo poder resolvente es como *uno*; este objetivo llevará á la imagen detalles hasta un cierto tamaño pequeño, que llamamos a , y llevará á la imagen todos los detalles que en el objeto haya mayores que a . Si ponemos un objetivo de un poder resolvente mayor que *uno*, esta lente reproducirá en la imagen del objeto todos los detalles que reproducía el de poder resolvente *uno*, y, además, otra porción de detalles más pequeños que a , que eran los más pequeños que reproducía el de *uno*.

Mientras más grande sea el poder resolvente de un objetivo, más pequeño será el detalle que podremos ver con él. Y claro está, como al que mira por el microscopio lo que le interesa es penetrar todo cuanto pueda dentro de la estructura íntima del cuerpo que examina—y esta es, afortunadamente, una tendencia general del hombre, no exclusiva del microscopista, la de profundizar cada vez más—, dicho se está que el poder resolvente es el factor que figura en primer término en las cualidades del objetivo. (*Muy bien, muy bien.*)

Nos dice la fórmula que el valor de R depende de una fracción cuyo numerador es $n \text{ sen } B$, término al que llamó Abbe *apertura numérica*, siendo el denominador la letra que expresa la longitud de onda de la luz. De modo que hay dos caminos para aumentar el valor de R : uno, aumentar el numerador, y otro, disminuir el denominador, y así se planteaba el problema á los ópticos del año 73 cuando se publicó

esa fórmula. Claro está que á aquellos ópticos no se les ocurrió modificar el denominador de la fracción, y es natural; siendo el microscopio un aparato en que toda la observación se hace con los ojos, ¿cómo—decían ellos—vamos á alumbrar el microscopio con unos rayos que no se ven? Esto es evidente. Además, entonces no era familiar el espectro ultravioleta; se habían visto algunas radiaciones de esas propiedades, pero era un asunto algo nebuloso todavía. De modo que no se les ocurrió tratar de disminuir λ . Por lo demás, ya sabían ellos de un modo empírico que una imagen microscópica gana siempre cuando se alumbra con las radiaciones extremas del espectro visible; ignoraban por qué, pero lo sabían, y siempre que se trataba de llegar al límite de resolución de un objetivo se alumbraban con luz azul ó violeta, interponiendo un vidrio ó un líquido coloreado en el trayecto de la luz. Esto ya lo hacían, y no suponían ni se figuraban que se pudiera hacer más. Nuestros sabios dedicaron su atención á aumentar todo lo posible el numerador de esta tracción $n \sin B$. Vamos á ver lo que es esto.

Sen B es el del ángulo que forma con el eje óptico del microscopio el rayo límite, que es el último de todos los que el objetivo puede recoger y llevar á la imagen, Es claro que el valor máximo de sen B será 1; pero no se puede llegar á ese máximo porque entonces tendría que ser B un ángulo recto, y el rayo límite sería paralelo á la frontal del objetivo, y á eso no se puede llegar prácticamente; pero se ha llegado en la aplicación de la teoría de Abbe á perfeccionar los objetivos de tal manera, que los ópticos han conseguido, acercando mucho la frontal al objeto y haciendo una lente muy refringente, que el rayo mismo que incide en su bordé pueda ser desviado de manera que se obtengan para sen B valores superiores á 0,96, con una diferencia tan pequeña del máximo, que no vale la pena de ir más allá, porque no se añadiría gran cosa al valor de R , y además porque tendría dificultades enormes al objetivo con tan cortísima distancia frontal.

N es el conjunto de índices de refracción de todos los

medios que hay entre el objeto y la frontal del objetivo. Estos medios son: el medio sólido, líquido ó gaseoso (que puede ser el aire), que envuelve el objeto y sirve para montarle y fijarle; la laminilla de vidrio que recubre siempre al objeto; el medio que ocupa un espacio que tiene que haber forzosamente entre el frontal del objetivo y el cubreobjeto para que se pueda enfocar, medio que puede ser el aire si el objetivo es seco, el agua si el objetivo es de inmersión en el agua, ó el aceite de cedro si es de inmersión homogénea, ó cualquier líquido que no ataque al vidrio ni al metal que sirva de montura al vidrio; y por último, la frontal del objetivo, que es siempre un vidrio ó combinación vítrea.

Se hace cuanto se puede hacer por aumentar el valor de este signo n ; y en lo que á vidrios se refiere no ha habido dificultades grandes, porque la vidriería científica de Jena ha hecho vidrios cuyo índice de refracción supera á 2.

Respecto al líquido, se ha trabajado mucho, se ha revisado toda la química, todos los cuerpos de alto índice que podían servir para el caso, y no se ha podido encontrar ninguno de índice superior al del aceite de cedro que es 1,52, y que pueda aplicarse como líquido de inmersión sin que ataque á las sustancias orgánicas, ni al vidrio, ni al metal.

Se ha llegado, pues, como objetivo práctico, al objetivo de inmersión en el aceite de cedro, y digo como objetivo práctico, porque si bien hace muchos años se ensayó un objetivo de inmersión en monobromuro de naftalina, como éste corroe las materias orgánicas, resultó que servía para muy pocos casos y tenía tales restricciones en su uso, que la misma casa desistió de hacerlos y ya no los construye.

De modo que el límite máximo de apertura numérica se puede obtener con un objetivo apocromático de inmersión en aceite de cedro, siendo su valor de apertura numérica 1,40.

En este estado se ofrecía el problema á fines del siglo pasado. Y era triste tener que decir: hemos hecho lo posible por rebasar este límite; no podemos rebasarlo, no entreveremos la posibilidad de rebasarlo en el porvenir por las ra-

zonas que he dicho; hasta aquí llegamos y de ahí no hay manera de pasar. Triste cosa era esto.

Y entonces, y sólo entonces, se ocurrió fijarse en el denominador.

El primer inconveniente ya queda dicho: las radiaciones son invisibles. Pero entiéndase bien, lo son no porque la luz ultravioleta tenga una característica física diferente de las demás luces, nada de eso, sino sencillamente porque nuestra retina no está organizada para que esas radiaciones produzcan en ella la sensación de luz. "Tan es así—decían aquellos ópticos—que hay en la naturaleza un grupo de seres, un grupo de insectos, entre otros las hormigas, que ven perfectamente las radiaciones ultravioletas. Esto ya lo había descubierto el naturalista inglés Lubbock, y luego lo han comprobado otra porción de naturalistas. De modo que si nosotros pudiéramos alumbrar un microscopio con luz ultravioleta y colocar una hormiga en el ocular del microscopio, esa hormiga vería una porción de cosas que nosotros no vemos, y si luego pudiésemos hacer que la hormiga nos contara lo que había visto, nos enteraríamos de lo que ocurre allí." (*Risas.*)

La cosa produce risa, es evidente; pero no tanto si se tiene en cuenta que el hombre tiene á su disposición una hormiga muy fiel que ve las radiaciones ultravioletas con más facilidad que las hormigas, que es la placa fotográfica, la cual se impresiona grandemente por estas radiaciones. (*Aplausos.*) Y ahí tenéis reflejado lo que es el método de investigación con la luz ultravioleta: alumbrar el microscopio con estas radiaciones que nosotros no vemos, fotografiarlas, y luego estudiar la fotografía. Método indirecto por el intermedio de la placa fotográfica.

Este es el bosquejo del método. Vamos á ver ahora dificultades de otro orden que surgen en él.

Para fotografiar un objeto se necesita enfocararlo. Primera dificultad. Para enfocar una cosa hay dos maneras: una, viéndola, que es el método corriente, y otra, por tanteos. Se empezó á hacerlo por tanteos; es decir, alumbrar el objeto con

luz visible, enfocar la imagen de la cámara fotográfica, luego alumbrarla con luz ultravioleta y después hacer la fotografía.

Este método se dice muy pronto, pero claro, es de resultados muy inciertos, porque el foco del objeto no depende solamente de la longitud de la onda de la radiación; depende de otros elementos, de la naturaleza misma del objeto y de otra porción de factores, y claro, era un método que daba resultados unas veces, y muchísimas otras no; pero ya por aquel entonces se habían descubierto los rayos X, se había notado que había cuerpos que se hacían fluorescentes bajo la acción de los rayos ultravioletas, y que entre ellos figuraban muy especialmente las sales de uranio. La sal de uranio se usa en forma de pantalla opaca, que puede ser un papel impregnado de estas sales ó en forma de un vidrio en cuya masa se incorpora sal de uranio: se obtiene así una superficie que fosforece en cuanto llega á ella una radiación ultravioleta. De modo que si encima de un ocular colocamos un vidrio en cuya masa se incorpora sal de uranio, vemos una imagen que no es la imagen ultravioleta, sino la fluorescencia que esa imagen produce en las sales de uranio.

Esta imagen no es bastante clara para hacer un estudio detenido, y más cuando se trata de estudiar detalles muy pequeños; pero es suficiente para enfocarla, y esto nos da medios de enfocar directamente la imagen que se obtiene sin necesidad de apelar á aquel tanteo de antes.

Venía después otra dificultad, y era que todas las lentes se han construído siempre de vidrio, y como el vidrio es opaco para la luz ultravioleta, no se puede emplear. Se conoce un cuerpo en la naturaleza muy á propósito para esto: el cristal de roca, que es transparente ó bastante transparente á la luz ultravioleta. Pero el cristal de roca no es un cuerpo amorfo ni que cristalice en los sistemas cúbico ó cuadrático, sino que cristaliza en un sistema biáxico, el exagonal, y al atravesarle un rayo produce grandes aberraciones en la imagen, y, por consiguiente, no sirve para formarla exactamente; había que quitarle esta propiedad cristalina al

crystal de roca; y esto lo consiguió el Dr. Kohler fundiéndole y obteniendo glóbulos de cuarzo amorfo transparentes á la luz ultravioleta. Ya había material con que construir estas lentes.

Por último, hacía falta encontrar manantial de luz ultravioleta, porque las luces que se emplean corrientemente para el alumbrado, el gas, el petróleo, la misma luz eléctrica de arco, todas son muy pobres en estas radiaciones; y la luz del sol, que debe ser muy rica á juzgar por la enorme temperatura de aquel astro, como ya dije que el aire absorbe todas las radiaciones de onda corta, al atravesar la atmósfera terrestre esa luz del sol, no llegan á la tierra más que muy pocas radiaciones, y de las más próximas al espectro visible. También en esto vinieron á ayudarnos trabajos anteriores, especialmente los del sabio profesor Mascart, que había estudiado los espectros ultravioletas de muchos metales; y de estos metales se eligieron dos: el magnesio y el cadmio, que tienen una raya muy brillante dentro de este espectro, raya cuya longitud de onda es en el magnesio de 0,28 micras y en el cadmio 0,275 micras; y sobre estas dos rayas se trabajó y se tomaron como tipo. Y ya con todos estos elementos se pudo llegar, allá hacia los años 1904 y 1905, á las primeras instalaciones de luz ultravioleta, que después se han ido perfeccionando mucho hasta llegar al tipo actual.

Ahora debería yo describir minuciosamente una de estas instalaciones y presentar aquí una proyección de ella; pero no se puede hacer esto, porque sus aparatos se agrupan de tal manera, con el fin de que el operador, sentado en una silla, los pueda tener al alcance de su mano, que una proyección de ellos resulta siempre confusa, lo mismo que una fotografía, y no se puede por este medio dar idea de lo que es una de estas instalaciones. Sería preciso tenerla delante. Por consiguiente voy á decir brevemente en qué consiste.

Primero, producción de la luz ultravioleta, que se obtiene haciendo saltar una chispa eléctrica á gran tensión entre dos electrodos de cadmio ó de magnesio. La corriente se toma de la red del laboratorio, porque hacen falta tan solo

tres y medio amperios ó cuatro para tener la energía suficiente. Esta corriente se transforma hasta 8.000 voltios, si es continua, por medio de un carrete de inducción, y si es alterna, con un transformador. Además, se añaden en derivación dos botellas de Leyde en el caso de la corriente continua, y ocho en el de la alterna, como condensadores que aumentan la capacidad de los electrodos.

La chís pa obtenida, rica en radiaciones ultravioletas, entra en un aparato de descomposición cromática, aparato compuesto de un colector, dos prismas y un condensador. El espectro resultante se recoge en una pantalla de papel de uranio que sirve para elegir la radiación que se desea emplear, y una vez elegida se separa la pantalla y se dirige al microscopio la radiación. Dicho se está que estos aparatos están dispuestos mecánicamente de un modo muy preciso y exacto, para poderlos enfocar, centrar y manejar con toda facilidad. No entro en la descripción de estos medios mecánicos porque sería nimio en realidad.

El condensador, el portaobjeto, el cubreobjeto y, en general, todos los medios antes de llegar al objetivo, son de cristal de roca, y de cuarzo fundido el objetivo y el ocular, es decir, desde el momento en que se trata de formar imágenes, ya que no sirve para ello el cristal de roca.

Encima del ocular viene un aparato que se llama *visor*, que consiste en un vidrio de uranio, encima del cual hay una lente; ese vidrio de uranio se hace fluorescente á la imagen de la luz ultravioleta. Con la lente se mira esa imagen y se enfoca cuidadosamente, y luego, dando media vuelta á una columna de hierro que soporta los dos aparatos, visor y cámara fotográfica, se sustituye al visor la cámara, y la imagen, enfocada en el visor, queda enfocada en la cámara.

Debo advertir que una diferencia de dos ó tres centímetros de longitud en una cámara fotográfica cuando se trata de fotografiar imágenes microscópicas no tiene importancia ninguna; en cambio, una variación, siquiera sea de una diezmilésima de milímetro en el tornillo micrométrico del microscopio, altera por completo el foco. De modo que, como

se enfoca con el tornillo del microscopio, luego no se hace más que sustituir la cámara al microscopio; la fotografía sale siempre en foco y el procedimiento consiste en alumbrar el objeto, ver la imagen en el visor, centrarla, enfocarla, fotografiarla y luego observar esta fotografía.

Veamos ahora qué resultados nos han dado esta instalación y este sistema. El resultado viene expresado por la cifra 2,50 en comparación con la de 1,40; es decir, que el poder resolvente de la combinación óptica con luz ultravioleta es tal cual sería el de un objetivo ideal, imposible de construir, que alumbrado con luz visible tuviera una apertura numérica igual á 2,50. Digo esto para poder comparar dos cifras análogas, y, dicho de un modo sencillo, casi se ha llegado á duplicar el poder resolvente de los objetivos, puesto que el doble sería 2,80, y 2,50 no difiere gran cosa de 2,80.

Y todavía más: aquí no hay, hoy por hoy, una restricción tan grande para seguir adelante como la había en el caso de los objetivos alumbrados con luz visible. Estamos empleando una radiación que mide 0,28 micras, y hemos podido estudiar en la cámara hasta 0,15 micras. Falta todavía bastante camino por recorrer. Yo no creo, aunque nunca me atrevo á decir que no creo una cosa; pero, en fin, me parece poco verosímil que lleguemos á hacer microscopios que trabajen en el vacío, porque, en ese caso, claro está que el límite se alejaría mucho todavía; pero hasta que lleguemos á la radiación 0,15 ó 0,16, que pasa bien á través del aire, falta mucho camino por recorrer, y en ese camino se está.

Ahora vamos á ver prácticamente lo que significan estos resultados: y para eso, por medio de la proyección, que, afortunadamente, y gracias á la amabilidad de mi amigo el Sr. Madariaga, puedo hacer con toda facilidad, vamos á proyectar ahí lo que se llama un *testo* de microscopio. Los *testos* de microscopio son objeto naturales ó artificiales, que tienen detalles muy pequeños, cuanto más pequeños mejor, y que sirven para probar el poder resolvente de un objetivo para contrastarlo.

Entre esos hay uno que es célebre, que es la *amphipleura pellucida*: una alga monocelular que mide algunas centésimas de milímetro de longitud, cuyo interés no está en la valva, sino en los adornos que cubren á esa valva; y estos adornos son, en primer término, una serie de rayas paralelas, perpendiculares al eje de la valva, al rafe, y que entran en la diatomea á razón de 3.000 por milímetro; y en segundo lugar, hay otra serie de rayas perpendiculares á las primeras, paralelas al rafe, que entran en número de 6.000 á 7.000 por milímetro, y la intersección de las dos series de rayas da lugar á unas figuras redondas, á unas puntitas que los diatomistas llaman *perlas*, porque se parecen un poco á las perlas, y sobre cuya naturaleza se ha discutido mucho y se discute todavía. Pero esto no nos interesa; el saber la naturaleza de esas perlas es ajeno á nuestro objeto; lo interesante es verlas, sean lo que sean; y el problema más difícil que había en Microscopía antes de inventarse la luz ultravioleta era el ver las perlas de la *amphipleura pellucida*. Un diatomista célebre, el Dr. Enrique Van Heurck, Director del Jardín Botánico de Amberes, adquirió reputación extraordinaria por haber visto y fotografiado estos elementos. Para ello le fué necesario apelar á los objetivos más potentes que se conocían, aumentar la luz del extremo visible del espectro de un modo extraordinario, emplear el artificio de la luz oblicua, tan intensa como la del sol, poniendo en juego toda su grande habilidad técnica. Pues bien, la luz ultravioleta ha resuelto este problema de tal modo, que con ella lo difícil es no ver las perlas; tal es el enorme poder resolvente 2,50. Con luz central, con luz de cualquier inclinación, con el condensador más abierto ó más cerrado, se ven las tales perlas, y precisamente la fotografía que se va á mostrar á ustedes está tomada con luz ultravioleta y con luz central. (*Proyección; véase fig. 1.^a*)

Claro está que lo interesante aquí no es precisamente el que se vean las perlas, y perdónenme mis amigos los diatomistas, porque si de eso sólo se tratara, aunque es un problema muy interesante, no valdría la pena de haber gastado

tanto tiempo y tantos esfuerzos; pero es que ello sirve para demostrar que con este procedimiento se puede llegar á ver elementos que entran á razón de 6.000 por milímetro, y, por consiguiente, si se aplica esta combinación á una célula orgánica, á una roca, á un cuerpo cualquiera que interese conocer á fondo, se verán con facilidad todos los detalles que haya en él que sean iguales ó mayores que éstos de la *amphipleura pellucida*, y esto tiene un valor práctico inmenso.

De modo que, como resolución, ya hemos visto un ejemplo; ahora vamos á ver un resultado al cual se ha llegado de un modo casi inesperado, por decirlo así, puesto que nadie contaba con él cuando se empezaron estas investigaciones. Para ello hace falta una pequeña explicación que voy á hacer brevemente, porque va pasando el tiempo.

De las cosas que más importa estudiar al microscopio son los tejidos orgánicos, las células, los vasos, los componentes enteros del protoplasma, las fibras nerviosas, los músculos, las secreciones, etc. Todos sabéis lo que en los últimos años se ha hecho en esto. Pero un tejido orgánico, sea el que sea, no se puede mirar nunca al microscopio tal y como sale del animal ó del vegetal que lo contiene, en razón á que los protoplasmas que componen los elementos diversos de los tejidos, se parecen tanto, tienen una composición tan uniforme, diferencias tan pequeñas unos de otros, que el tejido entero es uniformemente transparente á la luz visible, y si se mira un tejido acabado de sacar del cuerpo del animal ó del vegetal se percibe una cosa translúcida donde se adivinan sus elementos y sus órganos; pero no se diferencian estos órganos lo bastante para poderlos estudiar con el detalle que se necesita; de modo que para estudiar un tejido orgánico hay que hacer lo que se llama *colorearlo*, es decir, tratarlo con un agente químico colorante que ejerza reacción sobre algunos de los elementos, y no sobre otros, y de ese modo aparecerán en el microscopio unos muy coloreados, otros poco coloreados y otros sin coloración alguna, y se podrán diferenciar y estudiar.

Mas para poder colorear un tejido se necesita primero hacer una operación que se llama *fixarlo*, que es sencillamente tratarlo por un líquido, ó emplear un artificio que impida que se pudra, porque los tejidos se pudren, se alteran espontáneamente; y después de *fixarlo*, es preciso endurecerlo, darle la consistencia necesaria para que pueda resistir á las manipulaciones que vienen luego. Después se procede á colorearlo; y por último, á montarlo y examinarlo.

En resumen, que el examen de un tejido exige una serie de medidas preliminares, una serie de operaciones previas cuyo conjunto forma hoy una ciencia que se llama *Técnica micrográfica*.

A veces pasan horas desde el momento en que se extrae el tejido hasta el en que se examina al microscopio, á veces pasan semanas, pero no es esto la gran dificultad; la gran dificultad consiste en que después de todas estas operaciones, de haber tratado un tejido, cosa siempre delicada, de estructura fina, con una porción de líquidos de desigual densidad que han producido un efecto de ósmosis, y además reacciones químicas, cuando ese tejido se coloca en el microscopio y se ven allí ciertos elementos, ciertas fibras gruesas y otras delgadas, siempre cabe esta duda: "Lo que estoy viendo ahí, ¿es lo que realmente hizo la Naturaleza, ó es algo que han hecho artificialmente los reactivos?„. Esta duda es inevitable. No quiero yo decir con esto—¡Dios me libre!— que los métodos histológicos no sirvan para nada. En manera alguna. Gracias á ellos se ha llegado á descubrimientos de tan colosal importancia como la microbiología, por ejemplo. Digan ustedes si no la tiene el haber descubierto el suero antidiftérico y otra porción de cosas; pero, sin embargo, la duda subsiste, y es preciso cotejar los resultados de unos métodos con otros, interpretar los unos de una manera y otros de otra. Se tarda mucho tiempo en llegar á un resultado, á una deducción; deducción que no pocas veces, hechos nuevos vienen después á desmentir.

Y aquí se nos presenta la aplicación de la luz ultravioleta basada en esa enorme sensibilidad de absorción, de que

os hablaba antes, por parte del protoplasma, el cual es uniformemente transparente á la luz visible, y es desigualmente transparente, muy desigualmente transparente, á la luz ultravioleta.

Esos elementos, de composición protoplásmica casi igual que integran un tejido orgánico, aparecen á la luz ultravioleta: unos muy claros, otros muy oscuros, otros apenas coloreados, apenas teñido por ella, lo bastante para diferenciarlos claramente unos de otros y poderlos estudiar á fondo. Y nótese que aquí la duda de que antes hablaba no puede existir; en primer lugar, porque se han suprimido de un golpe todas las operaciones de reactivos, porque no hay más que tomar esas partículas del animal, y, en fresco, ponerlas en el microscopio, y, por consiguiente, no hay el temor de que lo que allí se ve sea producto del reactivo, sino que lo que la luz ultravioleta nos muestra puede afirmarse con seguridad que es lo mismo que la Naturaleza nos ofrece, que no es algo que el hombre ha producido artificialmente.

Ahora voy á enseñar á ustedes, para demostrar esto prácticamente, un tejido de la *pachymatisma Johnstonia* que abunda en el litoral de Gijón; es un pedazo de esa esponja cortado en un microtomo, una rebanada muy delgada colocada en el aparato y sometida á la luz ultravioleta; pero cuidé de que el cubreobjeto fuese de cuarzo para que sirviera indistintamente para luz visible y luz ultravioleta, y así se obtuvo, primero una fotografía con luz visible, con luz azul, y con objetivo apocromático de la mejor calidad, y otra fotografía con luz ultravioleta, y van ustedes á ver la diferencia. (*Proyección; véanse la fig. 2.^a de luz visible, y la fig. 3.^a de luz ultravioleta.*)

Otro objeto elegido á propósito entre aquellos cuerpos orgánicos más difíciles de colorear, más transparentes que todos vosotros quizá conoceréis, es el tegumento externo de una *medusa*, de uno de esos que llaman *agua marina*, pequeños animales en forma de parasol, del que salen unos tentáculos tan transparentes que á veces en el mar no se

pueden ver en medio del agua. Ese tegumento externo es una epidermis muy delgada que cubre el parasol por su parte externa y es una de las cosas más transparentes que hay en la naturaleza, y más refractaria á ser teñida por estos métodos histológicos. Fotografiada con luz visible, no se vería más que una masa transparente. Vais á ver el resultado obtenido con la luz ultravioleta. (*Proyección; véase la figura 4.^a*)

Y ahora, algo de carácter más práctico; que después de todo, las esponjas y las medusas no van á salvar á la humanidad. (*Risas.*)

Vamos á ver la aplicación de esta luz ultravioleta á cosa tan importante como es el sistema nervioso, y nada hay más importante que la fibra nerviosa, la fibra que sirve para conducir la sensación del cerebro á un órgano cualquiera.

La fibra nerviosa, en general, en los animales superiores, se compone: 1.º, de un tubo central hialino cuando se le ve longitudinalmente y finamente estriado cuando se le corta transversalmente, que se llama el *cilindro eje*, el alma de la fibra nerviosa. Está protegiendo á este tubo una envolvente de un cuerpo que se llama *mielina*, que es transparente, de consistencia pastosa, que protege á la vaina central, cilindro-eje; y protegiendo á la mielina existe una membrana que se llama *membrana de Schwann*, formada por un protoplasma muy condensado bastante duro: dicha membrana no es continua, sino que está formada por una serie de conos que permiten la extensión y compresión de la fibra, y, además, tienen otras funciones orgánicas en cuya explicación no entro porque sería en mí una pedantería.

Teñir y ver la fibra nerviosa, es uno de los problemas más difíciles de la histología moderna: reactivo que tiñe la mielina no tiñe el cilindro-eje, y reactivo que tiñe la membrana de Schwann no tiñe la mielina; son órganos de una finura tan extraordinaria que el menor reactivo que se emplee con ellos introduce alteraciones profundas en la estructura de la fibra nerviosa.

Veamos una fibra nerviosa acabada de sacar del animal

que la contenía y puesta en el microscopio fotografiada, y ustedes juzgarán si se ven ó no estos elementos. (*Proyección; véase la fig. 5.^a*)

Consideremos ahora un problema que reúne los dos factores que integran, por decirlo así, la investigación con la luz ultravioleta. Me refiero á la célula nerviosa humana.

Hace muchos años se discute en el mundo si la célula cerebral humana tiene envoltente ó no lo tiene, si está encerrada por una membrana ó no lo está. Un hombre, que es orgullo legítimo para España, uno de los primeros histólogos con que hoy cuenta el mundo, D. Santiago Ramón y Cajal, fundándose en razonamientos de orden histológico, porque la membrana no consiguió verla nunca, sostuvo siempre la existencia de esta membrana, y un grupo de histólogos europeos, que forman escuela, sostenían que no existía esta membrana, que la célula nerviosa comunicaba libremente con el ambiente que la rodeaba. Y el problema aquí tiene importancia grande, porque de que tenga ó no tenga la célula nerviosa cerebral membrana, se deducen consecuencias muy importantes respecto á la nutrición y á la reproducción de esta célula y, por consiguiente, respecto á si es posible rehacer una parte destruida del cerebro ó no es posible rehacerla. Y ya puede juzgarse de la trascendencia de este hecho en terapéutica. Por consiguiente, saber si había membrana era un problema de cierto interés en materia de luz ultravioleta, y claro está que sin poderlo remediar á él se tendía. De haber membrana tenía que ser muy tenue, puesto que con los objetivos más potentes conocidos para luz visible y con todos los artificios de óptica no se había conseguido ver, y notad, señores, que se habían visto esas perlas á que antes me he referido, que se habían visto elementos que entran á razón de 6 á 7.000 por milímetro, y, sin embargo, la membrana celular no se había visto, y debía ser, además, un elemento muy difícil de teñir, muy difícil de diferenciar, de una composición muy semejante al protoplasma que envolvía, puesto que ningún método histológico había permitido diferenciarla.

Para esta fotografía se ha elegido una célula de Purkinje del cerebelo humano, cortada con un microtomo, de manera que el corte sea diametral ó transversal, no tangencial, para que se destaque la membrana, si la hay, y se ha reproducido con luz ultravioleta. No me atrevo á decir si hay membrana, ó no, en manera alguna. Claro está que los partidarios de la existencia de la membrana aseguran que es evidente que se ve; pero ustedes van á ser jueces, y verán si la célula de Purkinje del cerebelo humano tiene ó no membrana. (*Proyección; véase la fig. 6.^a*)

Para terminar, señores, hablemos de un aspecto de este género de investigación, que puede tener aplicación directa á nuestra profesión de Ingenieros.

No constituye todavía un método, pero es la iniciación de un camino que pudiera servir de algo. Esto requiere un poco de historia.

En Gijón hay una obra de mucha importancia para el pueblo, que es el puerto del Musel, de la cual está encargado un hombre que es honra del Cuerpo de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos, mi amigo D. Eduardo de Castro, hombre que reúne á una gran inteligencia y una gran laboriosidad, algo que casi vale tanto como esas condiciones, que es un amor extraordinario á su obra; y como el que un cemento ó un bloque de cemento sea bueno ó no es muy importante y ello depende casi exclusivamente de que al fraguar el cemento quede ó no quede cal libre, el averiguar si en un cemento hay ó no cal libre, es problema de mucha importancia para el que hace la obra. Hay una reacción con un cuerpo colorante que permite determinar si un cemento tiene ó no libre esa base; pero pasa con esta reacción algo de lo que sucede con esos métodos histológicos de que antes hablé: que unas veces resulta bien, otras veces es dudosa y en otras los resultados prácticos no corresponden del todo á lo que dicen los resultados obtenidos con el microscopio. De ahí que mi amigo Castro me rogase que viera si había alguna manera de determinarlo mejor; y me ocurrió hacer un ensayo, cogiendo un trozo de cemento que me constaba que

estaba perfectísimamente fraguado y verle al microscopio con luz ultravioleta, y observé que, pulverizando ese cemento, tamizándole de manera que todos los granos fueran de igual grueso, y colocando unas partículas en el microscopio con luz ultravioleta, se veían una serie de granos, todos uniformemente transparentes; y si se añadía una partícula por pequeña que fuese, de cal libre, inmediatamente esa cal libre se acusaba porque sus granos eran extraordinariamente opacos á la luz ultravioleta. Sabía que la cal libre era muy opaca, por otra razón que contaré ahora. No ha habido tiempo de hacer más ensayos, de modo que las cosas no han pasado de aquí; pero si entre mis oyentes hay alguno á quien le interese la cuestión, bueno es que sepa que por ahí quizás haya un camino para determinar con toda precisión la presencia de la cal libre en un cemento, Tiene la ventaja de que la técnica es muy fácil; basta pulverizar un pequeño trozo de cemento, colocar unas partículas en el microscopio y mirar las fotografías: si hay cal libre se acusará por las partículas opacas. Al menos, cuando se añaden esas partículas, se ve que son absolutamente opacas, apareciendo puntos negros en la masa general.

Y yo sabía que la cal era muy opaca porque también tropecé con este problema en una especie de aventura en la que me he metido, que consiste en estudiar una región de España, que se llama la Serranía de Ronda, donde hay una porción de piedras que mirar.

En las piedras, en las rocas, hay un problema de bastante importancia, que no se resuelve del todo muchas veces con el famoso agente *luz polarizada*, que es el que se emplea para estudiar las rocas. Me refiero á la determinación de los feldespatos. Son los feldespatos mezclas en proporciones muy variadas de silicatos múltiples que forman serie, con gradaciones insensibles, desde un término, silicato doble de alúmina y sosa, hasta otro extremo, silicato doble de alúmina y cal, donde no hay sosa ninguna, é intermedia toda clase de minerales, con más sosa ó menos sosa, con más cal ó menos cal. Determinar cuál es, aproximadamente,

siquiera la proporción de cal y la proporción de sosa, no es sólo una curiosidad científica ó mineralógica, es algo que tiene importancia porque está en relación con la edad de la roca, y claro está que la edad de una roca tiene su importancia en Geología. Es este un problema no del todo fácil en luz polarizada, porque aunque hay métodos admirablemente estudiados, como, por ejemplo, el método de Michel Levy y otros, se necesita encontrar en la roca ese cristal de feldespato cortado con ciertas orientaciones para poder llegar á la certidumbre y, además, los ángulos de extinción que sirven de base. Se miden á veces teniendo que apreciar minutos, y esto no es tan fácil cuando no se conoce exactamente la orientación de una sección. Aplicada la luz ultravioleta, acusa diferencias de cal en estas mezclas. De ahí viene á averiguar que la cal era opaca á la luz ultravioleta. Procuré una serie de feldespatos puros, cuya composición química conocía de antemano, los pulvericé iguales todos los granos valiéndome de dos tamices, los puse al microscopio, y, efectivamente, pude ver que hay más opacidad cuando predomina cal que cuando predomina la sosa, y que esto, estudiado más, comparado más, visto más, podrá constituir quizá un método auxiliar que permita el estudio de los feldespatos. De ahí vine á averiguar que la cal era opaca, y de ahí vino ese pequeño ensayo que he indicado aquí sobre la determinación de la cal libre en el cemento.

Aquí concluye todo lo que me proponía decir de luz ultravioleta. Mas para complacer á algunos amigos aquí presentes, voy á presentar las proyecciones de fotografías en color de dos ejemplares de rocas serpentínicas, en diferente estado de transformación, obtenidas con luz polarizada. (*Proyección.*) (*Grandes y prolongados aplausos.*)

APLICACIONES DE LA LUZ ULTRAVIOLETA
por D. Domingo de Orueta

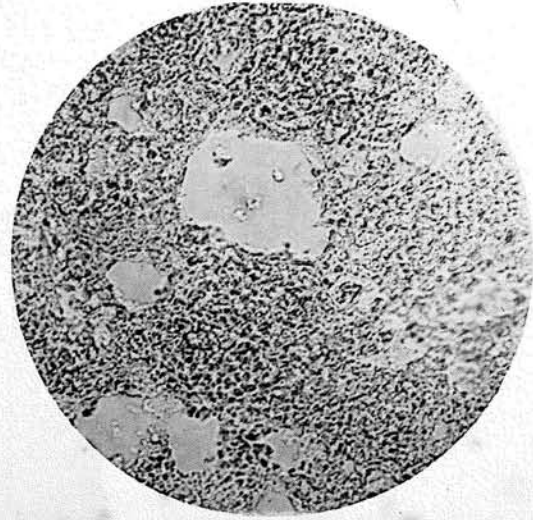


FIGURA 2.^a

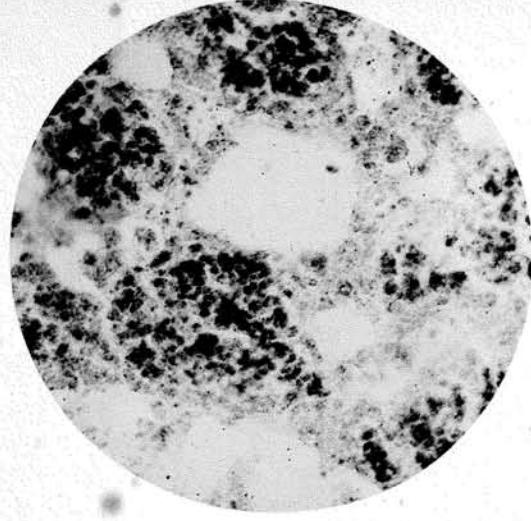


FIGURA 3.^a

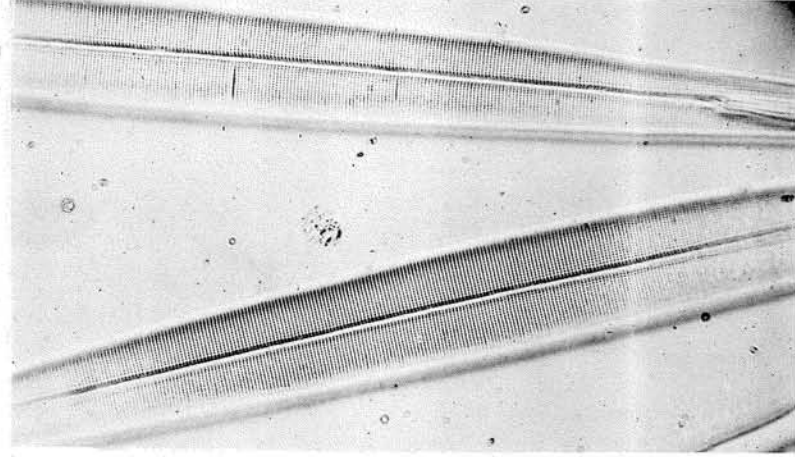


FIGURA 1.^a

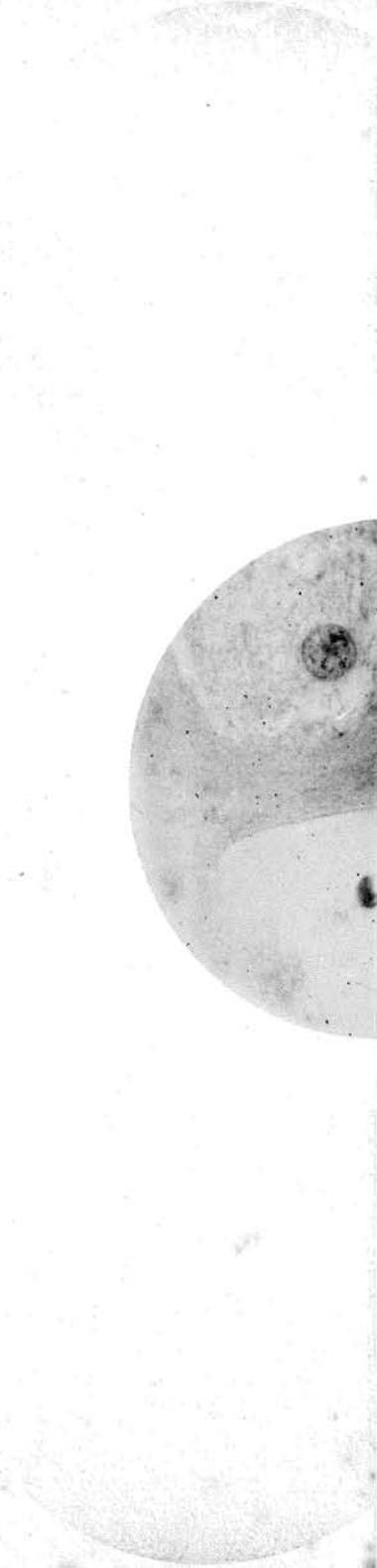


FIGURA 4.^a

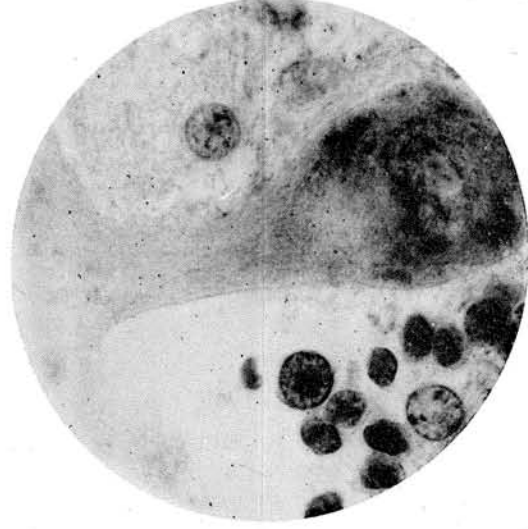


FIGURA 6.^a

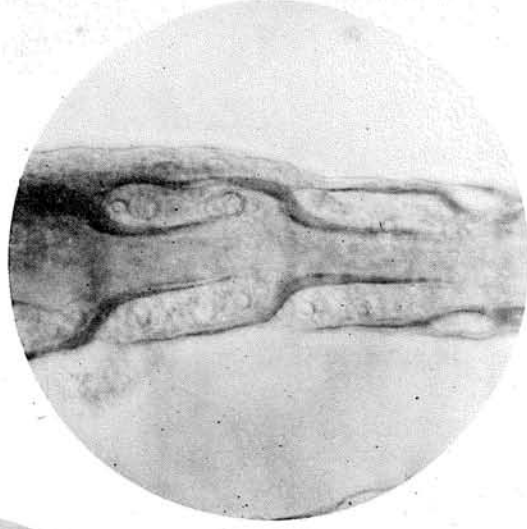


FIGURA 5.^a