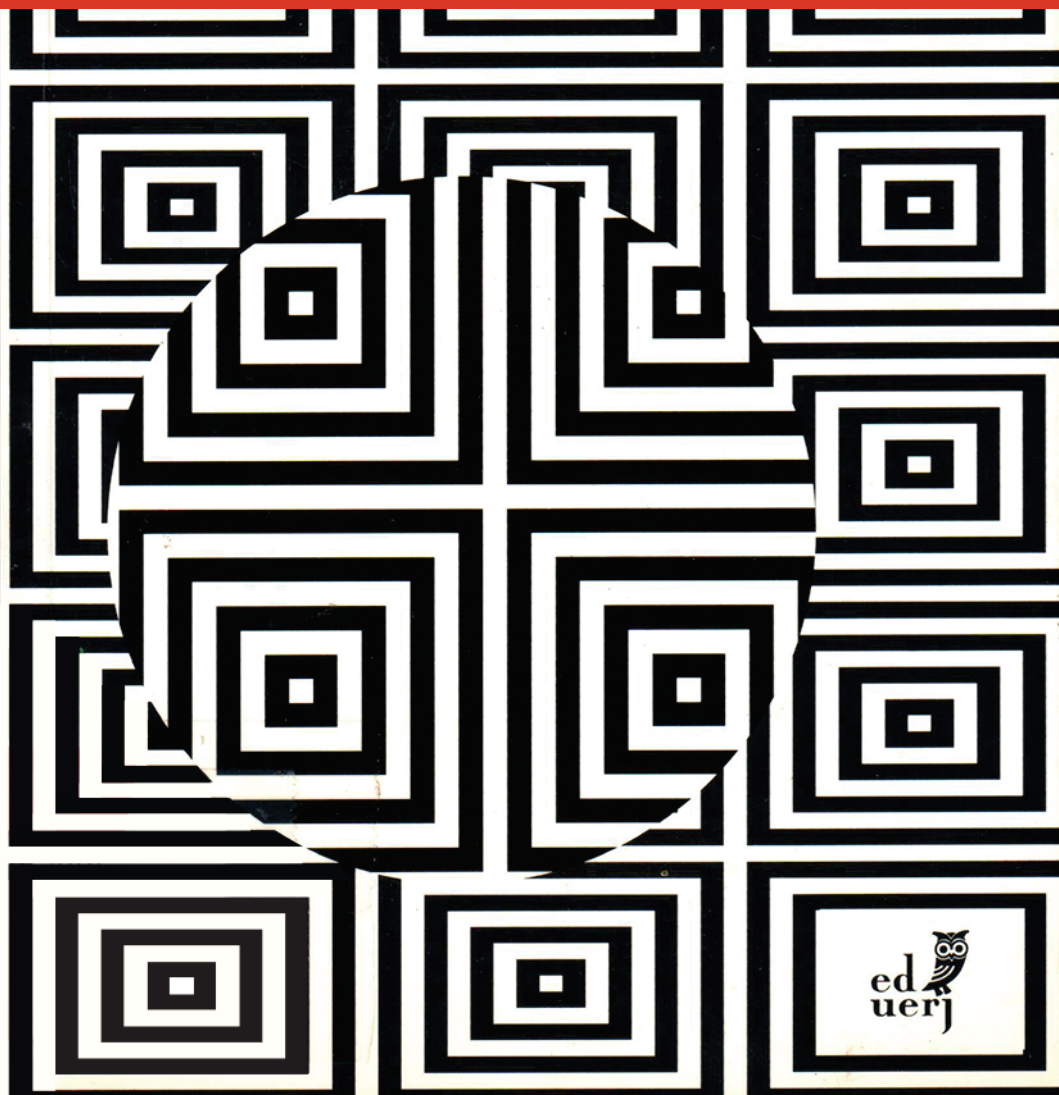


FUNDAMENTOS DE MICROSCOPIA

Luiz Henrique Monteiro Leal



ed
uerj



FUNDAMENTOS
DE
MICROSCOPIA



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Reitor

Nilcéa Freire

Vice-reitor

Celso Pereira de Sá

FUNDAMENTOS
DE
MICROSCOPIA

Luiz Henrique Monteiro Leal



Rio de Janeiro
2000

Copyright © 2000, Luiz Henrique Monteiro Leal
Todos os direitos desta edição reservados à Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, ou de parte do mesmo, sob quaisquer meios, sem autorização expressa da Editora.



EdUERJ
Editora da UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
Rua São Francisco Xavier 524 - Maracanã
CEP 20550-013 - Rio de Janeiro - RJ
Tel./Fax.: (021) 587-7788 / 587-7789

<i>Coordenador de Publicações</i>	Renato Casimiro
<i>Coordenadora de Produção</i>	Rosania Rolins
<i>Revisão</i>	Ana Silvia Gesteira
<i>Projeto Gráfico/Diagramação</i>	Gilvan F. Silva
<i>Ilustrações</i>	Ari Nunes
<i>Capa</i>	Heloisa Fortes
<i>Apoio Administrativo</i>	Maria Fátima de Mattos

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/PROTAT

L435 Leal, Luiz Henrique Monteiro
Fundamentos de microscopia / Luiz Henrique Monteiro Leal. –
Rio de Janeiro: EdUERJ, 200.
128 p.

Bibliografia: p. 127-201
ISBN 85-85881-94-1

1. Microscópio e microscopia. 2. Microscopia ótica. 3. Microscopia eletrônica. I. Título.

CDU 553.086

Apoio:



Este manual é dedicado aos meus pais, familiares, à Loraine, ao Waldemar, ao Sr. José Roberto Neves, aos amigos do DHE, aos colegas da UERJ, aos meus alunos do laboratório de microscopia e aos meus amigos da Carl Zeiss, por seu apoio inestimável e paciência, durante todos esses anos de convívio.

Índice

Apresentação	9
1. História da Microscopia	11
2. O Microscópio Óptico ou de Luz	19
3. Técnicas de Contraste em Microscopia de Luz	31
4. Microscopia Eletrônica	41
5. Aquisição e Processamento de Imagens	59
6. Fotomicrografia	71
7. Sistemas Especiais de Microscopia	77
8. Métodos e Equipamentos de Preparo de Amostras em Microscopia de Luz e Eletrônica	91
9. Glossário e Pequeno Dicionário de Microscopia	99
10. Sites na Internet	125
11. Leitura Complementar	127

Apresentação

“Em microscopia, como em qualquer coisa na vida, o mais importante é agir com bom senso, mas com o bom senso não se ensina, resta-nos torcer para que com ele tenhamos nascido”.

“A maior parte dos problemas na operação dos microscópios está entre o aparelho e a cadeira”.

Microscopista anônimo

O propósito da elaboração deste trabalho foi organizar um texto que servisse de manual básico para estudantes nos diversos cursos nos quais se utiliza o microscópio.

Neste livro, procuramos abordar os princípios básicos da microscopia de luz, da microscopia eletrônica e do processamento de imagens. No capítulo de microscopia especial, apresentamos também algumas informações sobre equipamentos e técnicas mais modernas, como a microscopia confocal, microscopia digital e a microscopia analítica.

Apesar de abordar diversos temas, a intenção do livro é fornecer os conceitos iniciais e não esgotar nenhum dos assuntos apresentados. Diversos livros são listados na bibliografia recomendada, para aqueles que desejem explorar um pouco mais esse fascinante assunto.

Este trabalho também tem como intenção atingir um outro público-alvo, aquele formado por indivíduos que utilizam a microscopia em seus trabalhos, no dia-a-dia. Durante as dissertações sobre os diversos temas, procuramos dar dicas e sugestões para auxiliar também na escolha do equipamento ideal para cada situação. Levando-se em consideração que microscópios de qualidade são instrumentos caros, devemos procurar sempre obter o máximo de informação antes de fecharmos qualquer negócio.

Por fim, também é útil listarmos alguns *sites* na Internet, onde informações variadas sobre este assunto podem ser obtidas.

Luiz Henrique Monteiro Leal

HISTÓRIA DA MICROSCOPIA



*O microscópio de Sir George Adams, cerca de 1770.
Reproduzido com permissão do Museum of Microscopy, Florida
State University, Florida, USA.*

O **microscópio de luz**, assim como toda grande descoberta científica, não surgiu de repente. Foi desenvolvido a partir do acúmulo de diversas experiências durante séculos. Existem algumas referências ao uso de lentes ou da descrição do polimento de cristais, com a finalidade de se criarem instrumentos capazes de aumentar as imagens, antes mesmo da Era Cristã. Mas o grande desenvolvimento das lentes ocorreu a partir do surgimento dos primeiros óculos, por volta de 1280, na Itália. Com o desenvolvimento dos óculos, o aparecimento dos primeiros microscópios foi simplesmente uma questão de tempo.

A palavra microscópio foi criada pela Academia dei Lincei, uma sociedade científica que tinha Galileu como um dos membros. O primeiro microscópio composto de que se tem notícia teria sido desenvolvido por um holandês de nome Zacharias Jansen. Esse microscópio, relativamente simples, era formado por duas lentes que produziam um **aumento** máximo de 9X. A partir do aparecimento desse aparelho, a fabricação de microscópios se espalhou rapidamente pela Europa. Em pouco tempo, foram construídos microscópios utilizando sistemas de três lentes, os quais eram mais adequados à observação, pois além de conservar melhor a luz, apresentavam oculares com distâncias focais menores. A criação desses aparelhos possibilitou o desenvolvimento dos primeiros tratados anatômicos de microestrutura, como por exemplo os trabalhos de Marcello Malpighi, por volta de 1660, e o de Robert Hooke, em 1665, cujo livro, muito apropriadamente, intitulou-se *Micrographia* (figura 1).

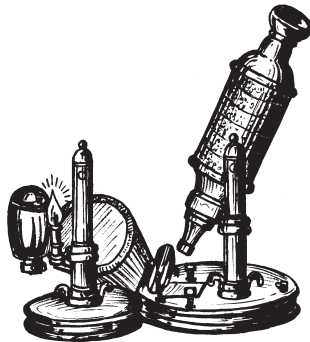
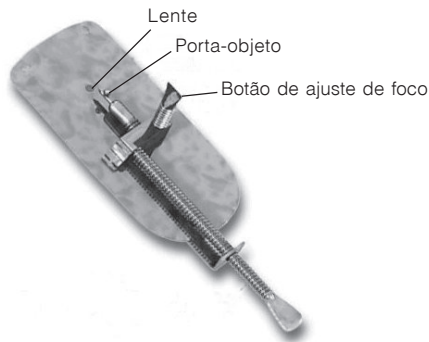


Figura 1: Microscópio de Robert Hooke, 1665.

No final do século XVII, um cidadão holandês de nome Antoni van Leeuwenhoek, que trabalhava com polimento de vidros, desenvolveu um microscópio simples (formado por uma só lente), com capacidade de aumento muito superior à de seus antecessores. Leeuwenhoek concebeu, por volta de 1670, um microscópio que era capaz de gerar imagens com aumentos superiores a 200X, com **resolução** aproximada de $2\mu\text{m}$. A diferença entre os microscópios anteriores e os de Leeuwenhoek estava justamente na qualidade das lentes. Através da utilização de lentes muito bem polidas e únicas, este cientista amador evitava as **aberrações** comuns aos outros microscópios. Os aparelhos desenvolvidos até o momento, mesmo em baixos aumentos, apresentavam aberrações cromáticas e esféricas. Essas aberrações eram amplificadas pelo número de lentes utilizadas. Isto é, em um microscópio composto por três lentes, as aberrações eram o resultado dos defeitos de cada uma das lentes, amplificados de uma lente para outra. Utilizando os microscópios de sua própria fabricação (figura 2), Leeuwenhoek foi o primeiro a descrever protozoários, bactérias e seus próprios espermatozoides.



*Figura 2: O microscópio de Leeuwenhoek, 1670.
Reproduzido com permissão do Museum of Microscopy, Florida State University, USA.*

A partir do século XVIII, diversos aperfeiçoamentos mecânicos foram implementados. Lamentavelmente, poucas melhorias efetivas foram feitas nas lentes. Por isso, o microscópio simples de Leeuwenhoek continuava muito superior aos outros. No entanto, houve melhoria no

ajuste do foco, na posição do espécime e até no material usado para o corpo e **estativa** do aparelho. Outras melhorias observadas durante o século XVIII foram: a utilização de espelhos para condensar a luz do sol ou de uma vela sobre o espécime e um sistema de troca de lentes, que possibilitava a utilização de diversos aumentos em um mesmo aparelho (figura 3).



Figura 3: O microscópio “inovador” de Sir George Adams (cerca de 1746).

Apesar de as primeiras experimentações com lentes **acromáticas** (veja aberrações na página 24) terem começado durante o século XVIII, as primeiras lentes corrigidas foram utilizadas em telescópios, nessa época muito mais populares do que os microscópios. Só em meados do século XIX é que os primeiros microscópios com lentes acromáticas foram fabricados. Por volta de 1830, outro problema comum em microscopia começava a ser solucionado: a aberração esférica. Em 1840, os primeiros microscópios com lentes corrigidas começavam a ser fabricados. Como existiam diversos modelos de microscópios nessa época, os microscopistas procuraram e encontraram na natureza vários elementos que poderiam ser utilizados para análise da capacidade de resolução e qualidade dos microscópios. A alga diatomácea, com a característica ornamentação de sua parede celular, serviu e serve muito bem para este propósito.

Foi somente em 1877, através dos estudos de Ernst Abbe, que a fórmula e os fatores que limitavam a resolução em microscopia foram

conhecidos. Como veremos posteriormente, Abbe concluiu que o poder de resolução de uma determinada lente dependia da **abertura numérica** da lente e do **comprimento de onda** da luz utilizada. Nessa época Abbe trabalhava em associação a Carl Zeiss, cujos microscópios a partir de então passaram a ser considerados os de melhor capacidade de resolução. Os microscópios fabricados no final do século XVIII, início do século XIX, com a utilização de objetivas a óleo, já alcançavam o máximo em resolução na microscopia de luz: $0.2\mu\text{m}$, utilizando lentes com abertura numérica de 1.4 (figura 4). Em 1893, com o trabalho do professor August Köhler, melhorias no sistema de iluminação dos microscópios começaram a ser discutidas. Apesar de o método de iluminação Köhler só ter sido amplamente divulgado a partir de meados do século XX, hoje é tido como fundamental para a obtenção de uma iluminação homogênea no campo observado.



*Figura 4: Microscópio de Hartnack & Prazmowski, 1880.
Reproduzido com permissão do Museum of Microscopy, Florida State University, USA.*

Com o século XX vieram diversas inovações na microscopia de luz. Além do desenvolvimento cada vez maior de objetivas com grande número de abertura e correções, este século também trouxe avanços na possibilidade de observação de material vivo sem a utilização de contrastantes. Em 1936, Frits Zernike, um físico holandês, em colaboração com a empresa Carl Zeiss, desenvolveu o primeiro microscópio de **contraste de fase**. A utilização da microscopia de **polarização** também se desenvolveu no início do século XIX, porém o fato mais marcante aconteceu no século XX: o desenvolvimento da **microscopia eletrônica**.

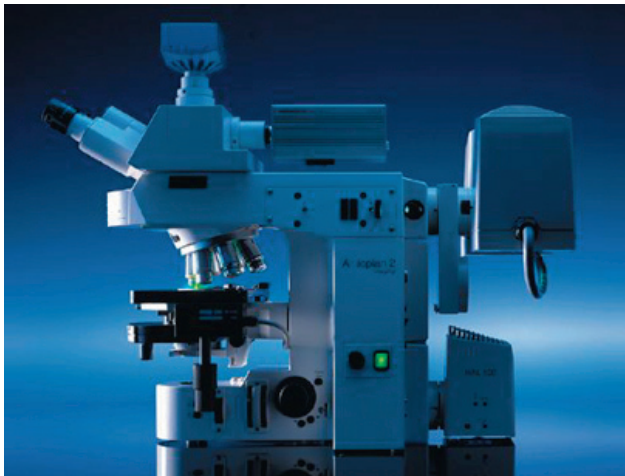
A história da microscopia eletrônica tem um passado mais recente. Podemos dizer que a partir das demonstrações feitas por De Broglie, por volta de 1924, mostrando que os elétrons apresentam propriedades ondulatórias, e pelos experimentos de Busch, em 1926, demonstrando que essas partículas poderiam ser defletidas por **lentes eletromagnéticas**, de forma semelhante ao que ocorre com a luz em lentes de vidro, o desenvolvimento do microscópio eletrônico foi uma questão de tempo. O primeiro microscópio eletrônico foi desenvolvido por Ernst Ruska e Max Knoll, na Alemanha, por volta de 1932. Segundo a autobiografia do Prof. Ruska, somente em 1939 os primeiros microscópios eletrônicos comerciais foram fabricados pela empresa Siemens. Com a participação de vários pesquisadores, inclusive do próprio irmão de Ruska, que era médico, as primeiras utilizações do aparelho para medicina e biologia foram realizadas no início da década de 40. Concomitante ao desenvolvimento do **microscópio eletrônico de transmissão**, em 1938, utilizando os mesmos princípios de Ruska, Von Ardenne desenvolveu o **microscópio eletrônico de varredura**. A partir da segunda metade do século XX, diversas empresas começaram a fabricar e a comercializar os microscópios eletrônicos.

A situação atual da microscopia revela avanços que, como em outras áreas, estão também ligados ao desenvolvimento dos sistemas de computação. Nos últimos anos, a microscopia de luz sofreu um grande salto tecnológico, com o desenvolvimento do **microscópio confocal a laser** e da **vídeo-microscopia**, sistemas em que há uma participação fundamental dos computadores, tanto no gerenciamento do micros-

cópio quanto na própria aquisição e manipulação das imagens. Na microscopia eletrônica, podemos observar implementação semelhante de computadores. Em sua quase totalidade, os microscópios de varredura comerciais são sistemas **digitais**. Atualmente é possível controlar quase todo o aparelho a partir de um **ambiente Windows** e através do *mouse*. Esta tendência já pode ser também verificada nos microscópios de transmissão. Alguns modelos modernos já integram diversos sistemas dentro de um ambiente Windows único e já conhecido por todos, o que torna mais simples a operação desses aparelhos. Uma outra vantagem inerente à associação dos computadores aos microscópios, sejam eles de luz ou eletrônicos, é a possibilidade de controlá-los a distância. Isto significa a possibilidade de se poder acompanhar de um outro local a operação e as imagens dos microscópios, o que sem dúvida será de grande utilidade na integração do conhecimento e pesquisa (veja mais a respeito deste e outros assuntos no Capítulo 7 - Sistemas Especiais de Microscopia).

Capítulo 2

O MICROSCOPIO ÓPTICO OU DE LUZ



Microscópio Axioplan 2.

Imagem gentilmente cedida pela Carl Zeiss do Brasil.

O olho humano, a despeito de ser um órgão altamente complexo e sofisticado, apresenta um limite máximo de resolução, isto é, capacidade de separar estruturas próximas, que é algo em torno de 0.2mm. Isto se deve ao fato de que a **distância focal**, limite para que possamos obter uma imagem nítida em nossa retina, é de 25cm. Abaixo disto, a imagem se tornará embaçada e não mais conseguiremos distinguir detalhes. A utilização de lentes de aumento e, mais modernamente, de microscópios, nos permitiu ultrapassar essas barreiras. O olho humano apresenta um ângulo específico de visão, o qual está evidentemente relacionado à distância em que objeto está do observador, como mostra a figura 1:

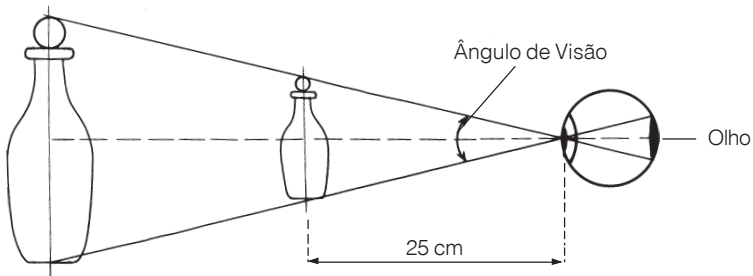


Figura 1: O ângulo de visão do olho humano.

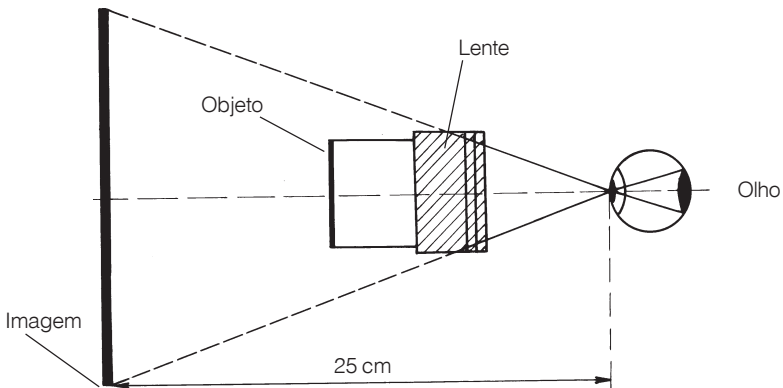


Figura 2: Formação da imagem por uma lente simples.

Ao usarmos um microscópio, forma-se em nossa retina uma imagem ampliada do objeto, pois as lentes apresentam distâncias focais menores que as distâncias do olho humano. Em outras palavras, aproximamos a lente do objeto até determinada distância, que varia de lente para lente e, como conseqüência, os raios refletidos ou refratados pelo objeto são acomodados de forma a estarem em foco, como mostra a figura 2.

A obtenção do fator aumento de um microscópio simples, por exemplo, de uma ocular, pode ser obtido através da fórmula:

$$M = \frac{f_{\text{olho}}}{f_{\text{lente}}}$$

Onde **M** é o aumento e **f** a distância focal (podemos considerar aproximadamente 25 cm **f** do olho e para uma ocular com 2.5cm de distância focal teremos 10X de aumento).

A maioria dos microscópios é composta de 2 ou mais lentes. De maneira geral, o microscópio utilizado em pesquisa biológica é composto dos seguintes itens: (1) o **iluminador**, formado pela fonte de luz e pelo **coletor**; (2) o **condensador**; (3) a **platina** ou **mesa**, sobre a qual se apóia o espécime; (4) as **lentes objetivas**; (5) a **ocular** (figura 3).

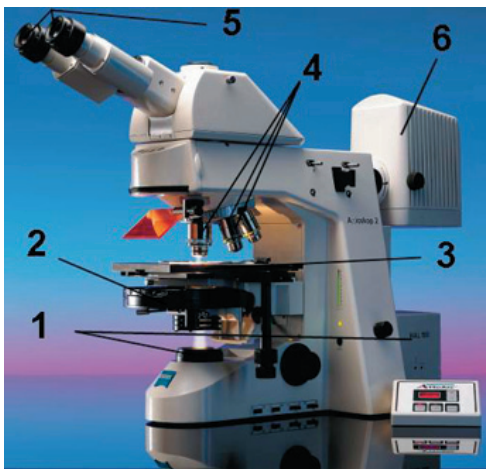


Figura: 3 O microscópio de luz moderno: Microscópio Axioskop 2. Imagem gentilmente cedida pela Carl Zeiss.

- 1 - Iluminador - Luz transmitida
- 2 - Condensador
- 3 - Platina/ Mesa
- 4 - Objetivas
- 5 - Oculares
- 6 - Iluminador Epi-iluminação

As **objetivas** são as lentes mais importantes dos microscópios profissionais. Os principais atributos das objetivas, além do aumento, são a abertura numérica (NA) e o grau de correção para aberrações. A abertura numérica das lentes traduz o ângulo, ou melhor, o seno do ângulo de abertura da objetiva. De uma forma bem simplificada, quanto maior a abertura numérica de uma lente, maior será sua capacidade de permitir a entrada de raios difratados pelo objeto, isto é, raios com ângulo de inclinação maior, como mostra a figura 4:

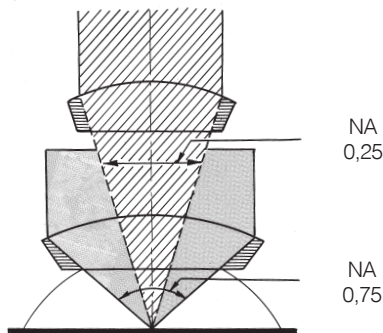


Figura 4: Comparação entre objetivas de aberturas numéricas diferentes.

A importância do ângulo de abertura está na sua relação com a resolução. Resolução significa a capacidade de se diferenciar dois pontos muito próximos como pontos separados e não como um único ponto. A resolução de uma determinada lente pode ser expressa pela seguinte fórmula:

$$D = \frac{\lambda}{2NA}$$

Onde **D** é a distância entre dois pontos (quanto menor o D, maior a resolução), λ é o comprimento de onda da luz e NA o número de abertura. A abertura numérica varia com o aumento e de objetiva para objetiva. O limite teórico de **NA** no ar é de 1,0, o que na prática significaria um ângulo de abertura de 180° da objetiva. Na realidade,

no ar, podemos alcançar a abertura numérica de 0,95, o que corresponderia a um ângulo de 140° . Objetivas a óleo podem alcançar um número de abertura de até 1,4.

Além da resolução que, como vimos, está ligada à abertura numérica da lente e ao aumento, outros fatores diferenciam as objetivas entre si. Estes fatores são as aberrações. Basicamente existem dois tipos de aberrações— as **cromáticas** e as **esféricas**. As aberrações cromáticas ocorrem em função da maior **refração** de ondas com comprimento de onda menor em relação às outras de comprimento de onda maior, causando franjas coloridas na imagem. Em outras palavras, raios luminosos com comprimento de onda no azul tendem a apresentar distâncias focais menores do que os raios no verde, e estes dois para o vermelho, como mostra a ilustração a seguir (figura 5):

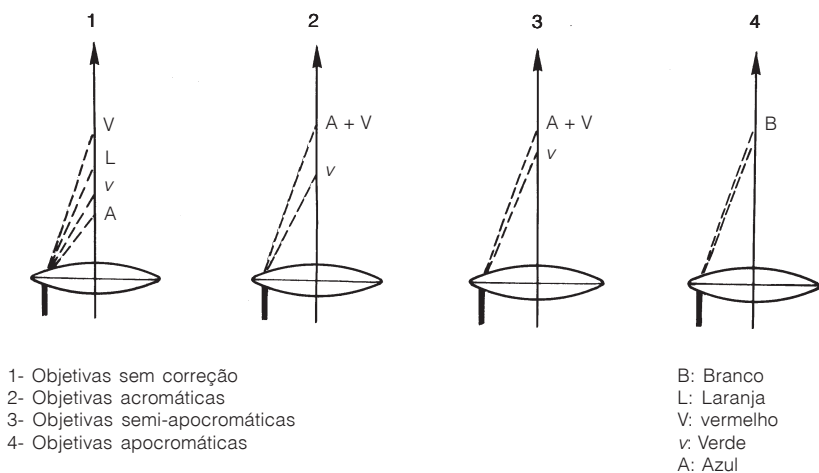


Figura 5: As aberrações cromáticas, redenhado de Abramowitz: "Optics: A primer", 1984.

As aberrações cromáticas podem ser corrigidas por lentes acromáticas, que corrigem as aberrações no comprimento de onda do vermelho e do azul. Lentes mais sofisticadas podem chegar a corrigir as aberrações cromáticas para até quatro comprimentos de onda.

Além das aberrações cromáticas, as lentes também apresentam aberrações esféricas. Estas anomalias ocorrem porque os raios que

percorrem as regiões periféricas de determinadas lentes tendem a focar antes dos raios que percorrem regiões mais centrais (ver figura 6). Desta forma, um ponto focado na imagem vai aparecer cercado por uma nuvem ou um halo claro formado pelos raios periféricos. A correção das aberrações esféricas é conseguida através da utilização de várias lentes unidas com diferentes planos de convexidade, garantindo que os raios periféricos e os axiais se reúnam em um mesmo plano de foco. Além dessas aberrações, muitas objetivas têm correção para **curvatura de campo**, sendo denominada *plano*. Em função da forma convexa das lentes, a periferia da imagem nunca está em foco ao mesmo tempo que a porção central. Esta aberração é conhecida como curvatura de campo, e é corrigida pelos fabricantes através da associação de lentes com formas, índices de refração e espaçamentos variados.

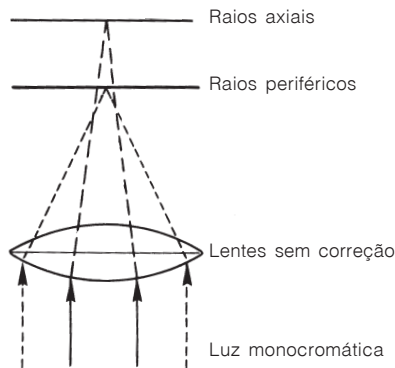


Figura 6: Aberrações esféricas.

Quando utilizamos um microscópio, devemos estar atentos a: (a) ao aumento proporcionado pela objetiva; (b) à abertura numérica da objetiva e, conseqüentemente, o seu **meio de trabalho** (**ar, óleo ou água**); (c) à qualidade de imagem da objetiva, dada em função das correções que ela apresenta.

As objetivas modernas (figura 7) são corrigidas ou focam para o infinito, são as objetivas conhecidas como “*infinity correction objectives*” ou *ICS (Infinity Correction System)*. Nos microscópios mais antigos ou nos mais simples, as objetivas eram ou são projetadas para produ-

zirem uma **imagem intermediária** e que seria amplificada pelas oculares a uma distância de 160mm. Nos aparelhos modernos com ICS, os raios emergentes das objetivas são paralelos e não convergentes, isto é, focam para o infinito. Para que esses raios sejam focados no **plano intermediário da imagem**, o microscópio deve ser equipado com lentes intermediárias (*tube lens*).



Figura 7: Objetivas de Fluorita (semi-apocromáticas) e Plan-apocromática.

Outra peça extremamente importante na produção de uma imagem de alta qualidade é o **condensador**. Atualmente, já é possível encontrar condensadores acromáticos. Além disso, condensadores com abertura numérica de até 1.4 devem trabalhar com óleo de imersão entre a lente e a lâmina, tal como acontece com as objetivas. No condensador está localizado um diafragma, conhecido como **diafragma do condensador**, que não deve ser confundido com o **diafragma de campo**, que está localizado na base do microscópio e que faz parte do sistema de iluminação (coletor). O condensador e seu diafragma são de extrema importância na formação da imagem, do **contraste** e da resolução. Isto se deve ao fato de que o diafragma do condensador determina o ângulo que será formado pelo cone de iluminação, que é maior para diafragmas mais abertos (com NA maior) e menor para diafragmas mais fechados (com NA menor). Na realidade, a resolução obtida em uma determinada imagem decorre da abertura numérica do condensador, somada à abertura numérica da objetiva. Com cones de iluminação mais largos, obtemos as maiores **frequências espaciais**, o

que significa que os **discos de Airy**¹ formados no **plano focal posterior** da objetiva estão separados, não havendo interferência de um com o outro, como mostrado na fórmula abaixo:

$$d = 1.22\lambda / (NA_{\text{obj.}} + NA_{\text{cond.}})$$

Onde **d** é a distância mínima entre dois pontos, λ é o comprimento de onda.

O aumento da abertura no diafragma do condensador implica necessariamente diminuição do contraste. Contraste, de uma maneira geral, é a capacidade ou a propriedade de uma determinada estrutura ser diferenciada do fundo, isto é, quanto maior for a diferença visual entre um ponto e o fundo, maior o contraste. “As letras deste livro apresentam grande contraste, já este trecho, por ter um contraste ruim, mal pode ser lido”. Em um microscópio, o contraste da imagem não é uma característica inerente do espécime. O contraste é o resultado da interação entre a luz que incide no material, do material e do próprio microscópio. Desta forma, quando fechamos o diafragma do condensador, reforçamos as baixas frequências espaciais, filtramos os detalhes e aumentamos o contraste. Para a observação de materiais de baixo contraste, devemos ajustar o NA do condensador para aproximadamente 2/3 do NA da objetiva, para obtermos uma imagem com boa resolução e bom contraste. Esta situação fica alterada quando utilizamos sistemas de vídeo-microscopia, como descreveremos mais adiante.

Além das características de contraste e resolução, devemos comentar mais dois pontos, antes de seguirmos nossa descrição do microscópio óptico: o **aumento útil** e a **profundidade de campo**. O aumento útil de um microscópio está evidentemente relacionado com a abertura numérica, que em termos práticos é de 1.4. Na realidade, como o aumento deriva da capacidade de aproximarmos um determi-

¹ Discos de Airy são os padrões de difração de pontos da imagem no plano focal posterior da objetiva.

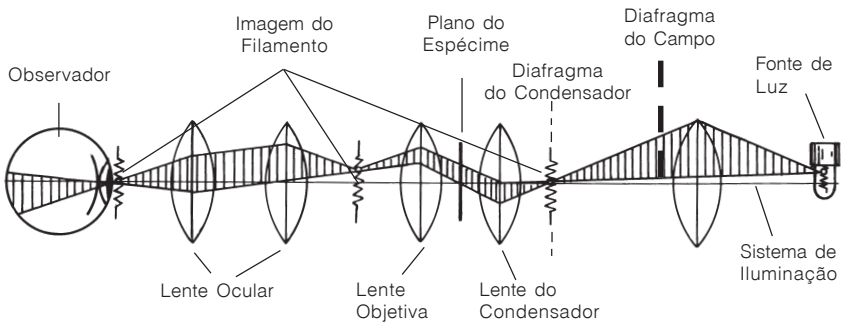
nado objeto e acomodarmos a imagem em nossa retina, o aumento na prática vai ser uma relação entre o limite de resolução do olho, dividido pelo limite de resolução do microscópio, o que corresponde a aproximadamente $0,15\text{mm}/0,0002\text{mm} = 750X$ ². Acima deste aumento, teremos aumento da imagem, sem a contrapartida em resolução, o chamado “**aumento vazio**”. Um outro ponto extremamente importante é a profundidade de campo. A profundidade de campo é a “fatia” óptica do material que pode ser ajustada em nível micrométrico sem alterar substancialmente a nitidez da imagem. Em termos práticos, quanto maior o NA, menor é a profundidade de campo. Um exemplo desta situação ocorre quando observamos células se deslocando rapidamente no meio, como protozoários ou espermatozóides nadando. Se procurarmos objetivas com maior resolução e aumento, corremos o risco de, a todo o momento, durante a observação, termos que ajustar o foco, pois pequenas variações de profundidade da célula acarretarão perda do foco pelo microscópio.

Na formação da imagem pelo microscópio, temos ainda as lentes **oculares**. Apesar de não terem a importância das objetivas, as lentes oculares podem, além de auxiliar na correção de aberrações residuais, apresentar **réguas de calibração, grades de calibração** etc. Além disso, podem ser ajustadas para acomodar observadores com diferentes acuidades visuais, sem a necessidade da utilização de óculos, e com a manutenção da correta focalização do espécime.

O conhecimento dos componentes ópticos do microscópio nos permite então verificar as formas ideais de ajuste, principalmente no que diz respeito à iluminação. A correta iluminação em microscopia é tão importante quanto a utilização de boas lentes. Basicamente existem dois tipos de iluminação por luz transmitida: a iluminação pelo método de **Nelson**, também conhecida como **iluminação crítica** e o método de **iluminação de Köhler**. Antes de comentarmos a respeito dos dois tipos de iluminação, convém discutir o que sejam **planos conjugados**.

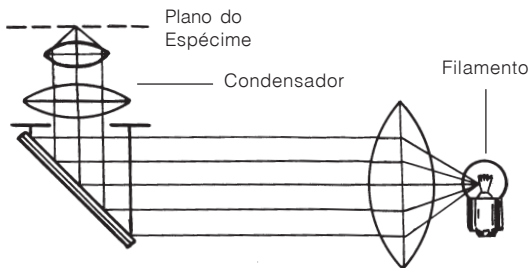
² Na realidade, este valor pode chegar até o dobro, para se assegurar que pontos adjacentes da imagem não estejam sendo focados em um mesmo receptor na retina. Da mesma forma devemos proceder com câmeras de vídeo, principalmente as baseadas em *chips* fotossensíveis.

Na figura 8, observamos que um determinado ponto do **filamento** vai ser focado em diversos pontos no caminho óptico do microscópio, sendo por fim focado no cristalino do observador. Desta forma, podemos dizer que o “filamento”, nesse determinado tipo de iluminação, está em plano conjugado com pontos A, B... e com ponto C no nosso cristalino; porém, como não está em plano conjugado com o espécime, não será focado junto a este.



*Figura 8: Planos conjugados do filamento.
Redesenhado a partir de Inoué: “Video-microscopy”, 1997.*

A iluminação crítica foi o primeiro tipo de iluminação a ser desenvolvida, quando ainda não existia luz elétrica (figura 9). Na iluminação crítica, a fonte luminosa é focada ou está em plano conjugado com o espécime. Desta forma, obtém-se ótima e máxima iluminação de uma determinada área, às custas da não-uniformidade de iluminação do campo.



*Figura 9: Iluminação crítica, redesenhado de Ruchow and Tucker:
“Introduction to Microscopy”, 1994.*

A iluminação crítica é utilizada não só em microscopia de luz, como em determinadas microscopias de fluorescência, mas também no modo *spot* do microscópio eletrônico de transmissão. Para a microscopia de luz convencional, a utilização da iluminação crítica, além de não iluminar o campo homogeneamente, tem a desvantagem de focar o filamento, que normalmente é uma espiral, no mesmo plano da imagem³.

Na iluminação de Köhler (veja figura 10), o filamento não vai estar em plano conjugado com o espécime. Neste tipo de iluminação, o filamento é focado na altura do diafragma do condensador, sendo que o diafragma de campo (aquele colocado na base do microscópio) é que vai estar em foco com o material (planos conjugados). No sistema de iluminação de Köhler, o campo é homogeneamente iluminado, não havendo interferência da imagem do filamento junto com a imagem do espécime, já que as duas imagens estão em planos conjugados diferentes.

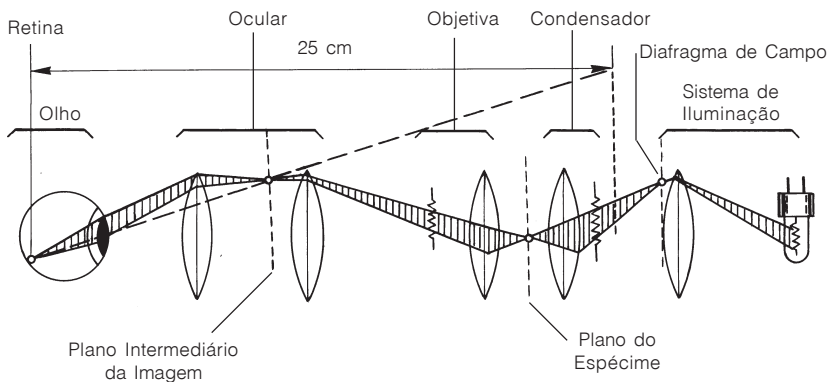
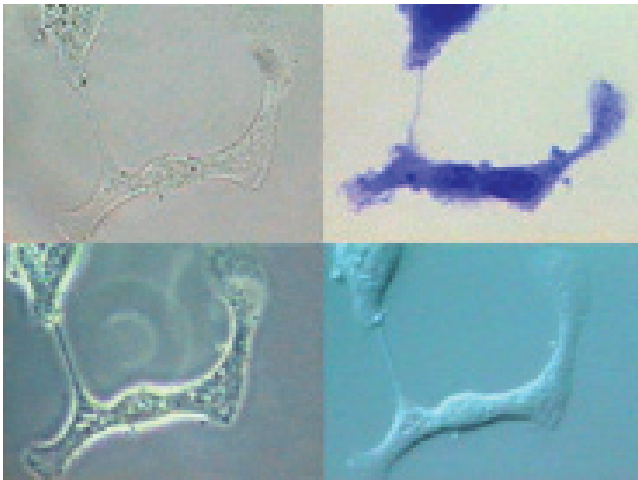


Figura 10: Planos conjugados do objeto na iluminação de Köhler. Redesenhado a partir de Inoué: "Video-microscopy", 1997.

³ Isto pode ser evitado utilizando-se um difusor no componente da lâmpada, o que acaba com o propósito de se utilizar a iluminação crítica, que é a de ter um foco de luz forte e direcionado em determinada região do material.

Capítulo 3

TÉCNICAS DE CONTRASTE EM MICROSCOPIA DE LUZ



Esta prancha apresenta quatro situações diferentes de contraste da mesma amostra: célula epitelial em cultura. Situação 1: em campo claro. Situação 2: coloração com panótico. Situação 3: contraste de fase. Situação 4: contraste interferencial.

O material biológico, com raras exceções, apresenta contraste muito pobre. Em **microscopia de campo claro**, aquela normalmente utilizada nos microscópios mais simples, somente estruturas que apresentem coloração própria, como cloroplastos e outras organelas contendo pigmentos, podem ser observadas diretamente, sem auxílio de contrastantes. De uma maneira geral, as pequenas variações de contraste do material biológico passam despercebidas pelo olho humano. Por isso utilizamos métodos específicos para criação de contraste. Quando optamos por observar um material fixado, podemos utilizar diversos tipos de corantes, os quais, absorvendo determinados comprimentos de onda e emitindo outros, criam contraste através de cores, onde não existia anteriormente. Porém, como uma das grandes vantagens da microscopia de luz ou óptica é a possibilidade de se observar espécimes vivos, os pesquisadores, principalmente durante o século passado e início deste, desenvolveram técnicas de contraste para serem aplicadas ao material vivo.

Microscopia de campo escuro (*dark-field*)

O sistema de contraste por campo escuro requer que toda a luz central ou a **luz de ordem zero**, aquela que passaria pelo material sem sofrer desvio, seja bloqueada. Para isto, coloca-se um disco opaco na peça do condensador, abaixo da lente condensadora. Como mostra o esquema abaixo (figura 1), somente os raios luminosos desviados pelo

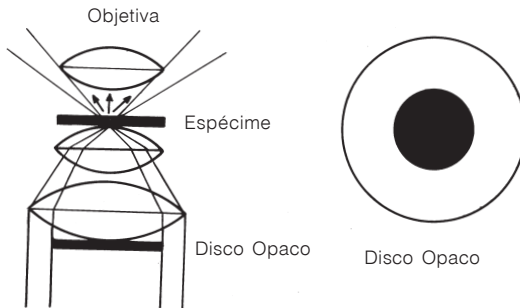


Figura 1: Microscopia de campo escuro. Redesenhada a partir de Abramowitz: "Contrast methods in Microscopy", 1987.

espécime têm a possibilidade de serem captados pela objetiva. Isto faz com que a imagem apresente o fundo escuro com os detalhes do espécime claros. Apesar de relativamente simples, esta técnica é de uso limitado. Normalmente só se observam as bordas ou formas do material estudado, além do fato de boa parcela da luz não contribuir para a formação da imagem. Este tipo de técnica é utilizado, por exemplo, para se observar motilidade em bactérias.

Iluminação Oblíqua

Nesta modalidade de iluminação, cria-se um aspecto pseudotrídimensional, através da colocação de um disco opaco em quase todo o caminho da luz no condensador, deixando-se apenas uma abertura em um dos lados da peça, como ilustrado abaixo (figura 2). O resultado desta técnica é a iluminação de apenas um lado do espécime, fazendo com que os efeitos de sombra criem um aspecto tridimensional na imagem. Uma outra característica da iluminação oblíqua é o deslocamento, para a periferia, dos raios de ordem zero, permitindo que raios de outras ordens, os quais trazem informações sobre o material e sofreram desvios ou refrações em ângulos variados, possam ser capturados pela objetiva, aumentando assim o seu poder de resolução.

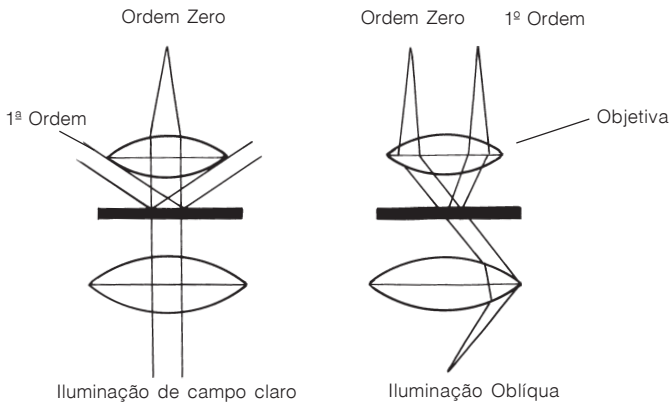


Figura 2: Microscopia por Iluminação Oblíqua.
Redesenhada a partir de Abramowitz: "Contrast methods in Microscopy", 1987.

Contraste de Fase

Dentre as técnicas de contraste apresentadas até agora para observação do material biológico sem fixação, é a técnica de contraste de fase que oferece os melhores resultados. Até o desenvolvimento desta técnica, a observação de detalhes em nível microscópico se limitava à identificação de formas. Apesar de ter sido superada em qualidade de imagem pela técnica de contraste interferencial (veja a seguir), o contraste de fase ainda é muito utilizado em pesquisa, sendo muitas vezes a única técnica de contraste utilizada por muitos laboratórios de cultura de células.

O material biológico, em geral, tem a característica de retardar a luz que o atravessa. Em comparação com a luz não desviada, a luz que atravessa uma estrutura biológica apresenta um retardo de aproximadamente $\frac{1}{4}$ de comprimento de onda. Materiais que apresentam essa característica são chamados de **objetos defasantes**. Apesar desse retardo no comprimento de onda da luz desviada, o resultado no plano da imagem é quase a ausência total de contraste. F. Zernike desenvolveu, então, os **anéis de fase**. Levando em consideração que determinados tipos de material, por atrasarem a luz em $\frac{1}{2}$ comprimento de onda, apresentam bom contraste, Zernike idealizou um método em que a luz direta não desviada era acelerada ou atrasada em $\frac{1}{4}$ de comprimento de onda. Para isto, um anel é colocado no plano do condensador, de tal forma que somente um disco de luz atravessa a imagem (veja figura 3). Um outro anel é colocado no plano focal posterior, de tal forma que toda a luz **não** desviada passará obrigatoriamente através deste segundo anel e a luz desviada pelo espécime **obrigatoriamente** passará por fora do anel. O anel do condensador é feito de forma que somente ele permita a passagem de luz. O resto do disco é opaco (veja figura 3). O anel colocado no plano focal posterior da objetiva é mais fino do que o material do resto do disco, de forma que a luz direta, ao atravessá-lo, é acelerada em $\frac{1}{4}$ de comprimento de onda.

Essa construção fará com que a luz direta fique com $\frac{1}{2}$ comprimento de onda à frente da luz desviada pelo espécime e, em oposição

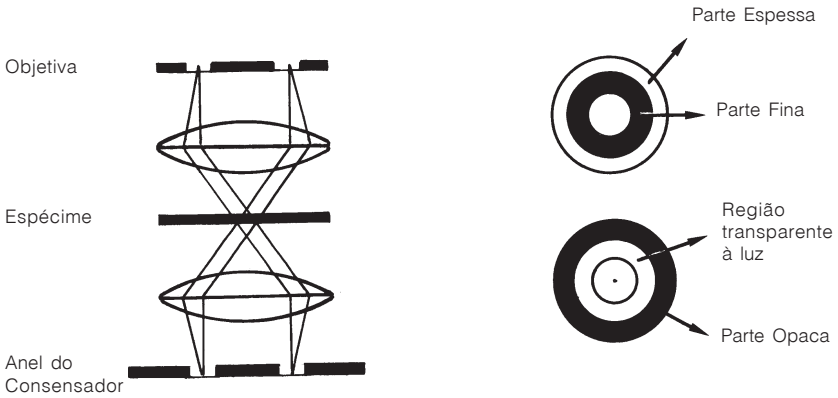


Figura 3: Microscopia por contraste de fase - anéis de fase. Redesenhada a partir de Abramowitz: "Contrast methods in Microscopy", 1987.

de fase, interferindo destrutivamente (veja figura 4). O resultado será uma imagem com fundo claro e o espécime mais escuro. Este é chamado contraste de fase positivo. Se, por outro lado, o material do 2º anel for feito de forma a ser mais espesso que o resto do disco, observaremos um retardo na luz direta e conseqüentemente uma **interferência** construtiva da luz desviada na luz direta. Como resultado, teremos o chamado contraste de fase negativo, no qual o espécime aparece mais claro que o fundo (ver figura 4).

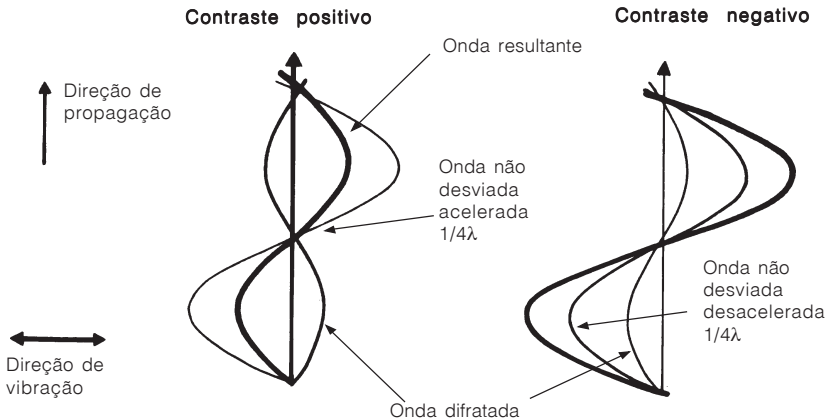


Figura 4: Interferência das ondas em microscopia de contraste de fase.

Contraste de Varel

Uma nova técnica de contraste, que mistura contraste de fase e iluminação oblíqua, foi desenvolvida. Junto aos anéis de fase, é introduzida uma nova peça que ilumina unilateralmente o espécime e interfere com a iluminação de fase. A imagem dá idéia de relevo, semelhante àquela observada no contraste interferencial.

Microscopia de Polarização

Neste tipo de sistema são reveladas, através de técnicas especiais, certas características do material, como a birrefringência. Para explicarmos o que vem a ser birrefringência e microscopia de polarização, veremos primeiro algumas características da luz.

A luz emitida por uma fonte tem uma ou várias direções, comprimentos de onda e planos de vibração. Se, no entanto, na frente dessas ondas colocarmos um filtro **Polaroid** e apenas um plano de vibração da onda puder passar, a luz é dita **plano-polarizada**. Caso coloquemos em seguida um outro filtro Polaroid cruzado em relação ao primeiro, toda a luz plano-polarizada será filtrada. Se entre os dois Polaroids colocarmos um material ou espécime birrefringente, a luz plano-polarizada será desmembrada em dois vetores perpendiculares entre si, e característicos do arranjo cristalino do material. A onda de luz formada pelos dois vetores é arranjada em forma elíptica. Se o eixo de orientação do cristal não coincidir com o eixo de polarização do primeiro filtro, a onda atravessará o 2º filtro Polaroid, chamado de analisador, mesmo este estando cruzado com o 1º filtro. Utilizando esta técnica, é possível verificar a orientação dos eixos cristalinos de um determinado material, além de revelar sua birrefringência (ver a figura 5). Além de separar a luz plano-polarizada em duas, deve-se assinalar que os dois vetores produzidos apresentam velocidades de propagação diferentes — uma frente viaja mais rápido do que a outra. Dessa forma, a utilização, nos microscópios de polarização, de uma peça chamada de compensador, que é um filtro birrefringente, pode revelar também qual é a frente mais lenta e a mais rápida da luz, após passar pelo

espécime birrefringente. Desde que se saiba a orientação dos eixos rápidos e lentos do filtro, podemos orientar o nosso espécime de forma que, se por exemplo, os eixos lentos do espécime e do **compensador** estiverem cruzados, nenhuma luz será observada após passar pelo **analisador**. Porém, se os eixos do compensador e do material estiverem em paralelo, mais luz será observada após a passagem pelo analisador. Desta forma podemos determinar não só a orientação dos planos, como os eixos rápidos e lentos do espécime.

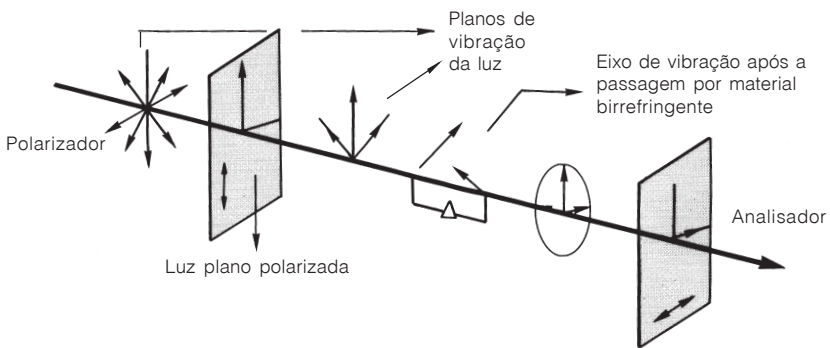


Figura5: Microscopia de polarização.

Contraste Interferencial de Normaski

Utilizando os princípios da microscopia de polarização, discutiremos agora aquela que é considerada a principal técnica de contraste em microscopia de luz. No **DIC** (*differential interference contrast*), um filtro Polaroid é colocado antes da peça do condensador. Um prisma funcionando como elemento birrefringente é colocado na peça do condensador e, como outros elementos birrefringentes, separa a luz polarizada em duas frentes de vibração, com velocidades um pouco diferentes. Estas duas frentes atravessam o espécime e têm suas características modificadas em função das características do espécime, como densidade, espessura e índice de refração. A fim de acentuar ou diminuir as diferentes características das frentes de onda, um segundo

prisma, conhecido como **prisma de Wollaston**, é colocado no plano focal posterior da objetiva e, junto com o analisador que está posicionado em seguida, recoloca no mesmo plano de vibração as ondas que vibravam em planos perpendiculares, de modo a interferirem umas com as outras. Dependendo do atraso causado pelo espécime à onda e do reforço dado pelo segundo prisma, o material vai aparecer mais claro ou escuro. A principal característica do DIC é a visualização nítida de detalhes do interior da célula, que aparecem com um aspecto tridimensional.

A organização dos Polaroids e dos prismas no microscópio montado para fazer contraste interferencial é apresentado a seguir, na figura 6.

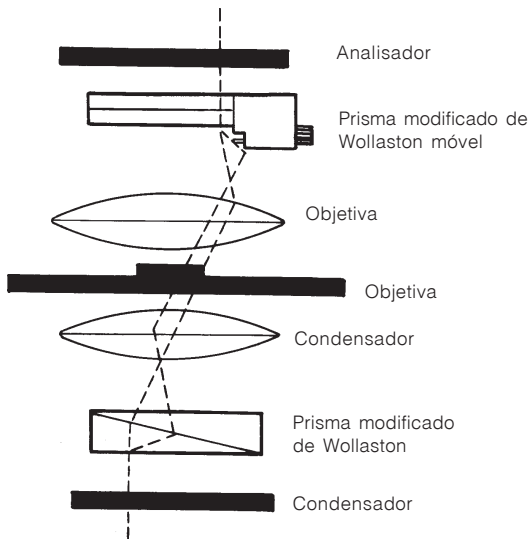


Figura 6: Microscopia de contraste interferencial de Normaski. Redesenhada a partir de Abramowitz: "Contrast methods in Microscopy", 1987.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA



Imagens obtidas por microscopia eletrônica. A imagem que está à esquerda, obtida por microscopia de varredura, corresponde ao epitélio da traquéia. A imagem à direita, obtida por microscopia de transmissão, corresponde a um corte de nervo, com fibras mielínicas e amielínicas.

O microscópio eletrônico é um equipamento desenhado para mostrar detalhes em alta resolução, através da utilização de um feixe de elétrons. Existem dois principais tipos de microscópios eletrônicos, classificados de acordo com o tipo de imagem que produzem: o microscópio de transmissão e o de varredura. Nestes microscópios, um feixe de elétrons é impulsionado sobre o material, e o que se observa é o resultado da interação dos elétrons com o material. O pequeno comprimento de onda dos elétrons é o responsável pela alta resolução nos microscópios de transmissão (chamados de MET) e nos de varredura (conhecidos como MEV).

Microscópio Eletrônico de Transmissão

No MET, a imagem é gerada pelos elétrons que passam através do material. O feixe resultante contém alguns elétrons originais que não tiveram suas características alteradas e outros que, ao passar pelo espécime, tiveram alteradas a velocidade e a direção. Como os elétrons



*Microscópio eletrônico de transmissão LEO 906.
Imagem gentilmente cedida pela Carl Zeiss do Brasil.*

não podem ser observados diretamente, a imagem no MET é vista através de uma **tela fosforescente** ou através da sensibilização de um filme.

De certa forma, podemos comparar o MET ao microscópio de luz (como visto na figura 1). As diferenças estão no tipo de filamento usado (normalmente na microscopia de luz, uma lâmpada de halogênio e, em MET, um filamento de tungstênio) e no fato de as lentes no MET não serem de vidro e sim eletromagnéticas.

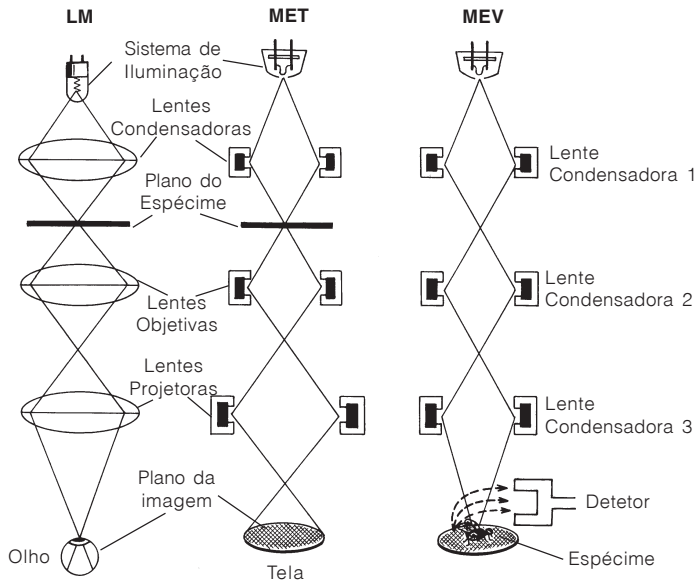


Figura 1: Esquemas comparativos entre os microscópios de luz, eletrônico de transmissão e eletrônico de varredura.

O microscópio eletrônico de transmissão é composto de vários sistemas integrados. O **sistema de iluminação** consiste do **canhão de elétrons** (*electron gun*) e das **lentes condensadoras**, que nos dão o controle da quantidade de radiação que deve chegar ao espécime. O sistema de manipulação do espécime é composto pelo **porta-objeto** e acessórios ligados à movimentação do espécime. O **sistema de imagem** – composto pelas **lentes objetivas, intermediária e projetoras** – projeta a imagem na tela de visualização ou na câmera fotográfica.

O **sistema de vácuo**, necessário para criar um ambiente adequado na coluna do microscópio para o deslocamento dos elétrons, como mostrado na figura 2.

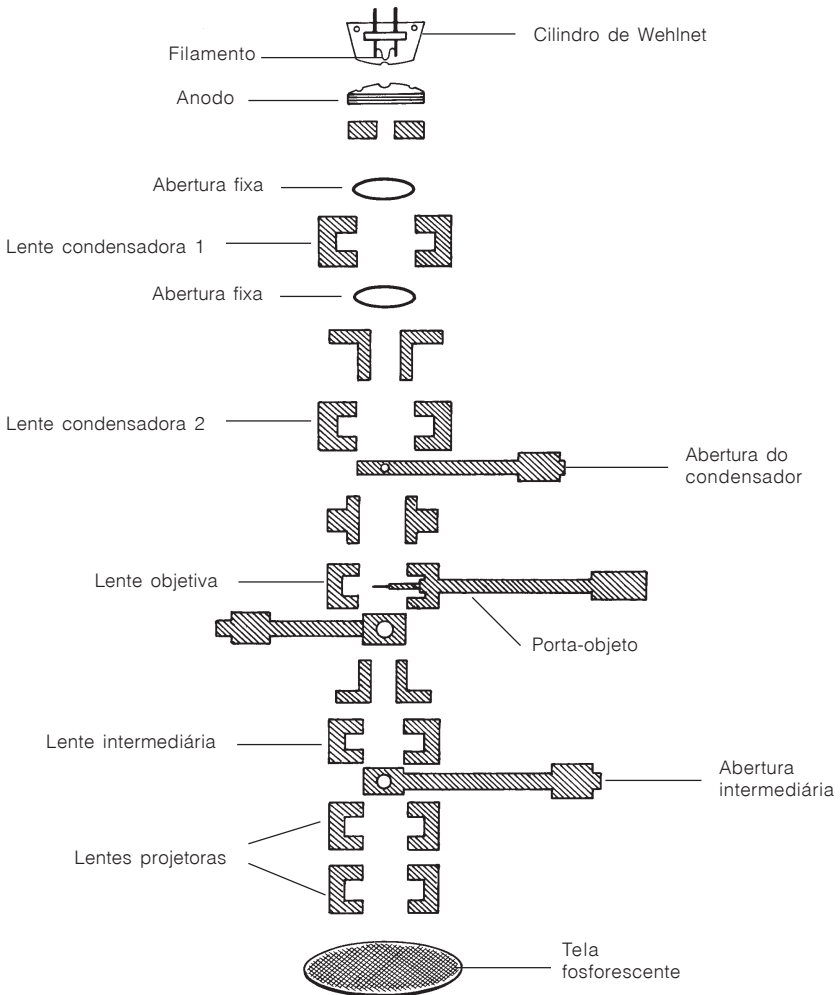


Figura 2: Esquema geral do microscópio eletrônico de transmissão. Redesenhado a partir de Bozzola e Russell: "Electron Microscopy", 1991.

O sistema de iluminação está situado no topo da coluna e é composto, como dissemos, pelo canhão de elétrons e pelas lentes condensadoras.

O feixe de elétrons é gerado numa peça conhecida como *electron gun*. O filamento funciona como catodo, composto de íons e elétrons livres. Os elétrons do filamento são arrancados através da aplicação de uma alta voltagem no filamento (que varia entre 50, 80, 100, 120 ou mais KV) e através do aquecimento do filamento, até começar a emitir elétrons. Em outras palavras, o filamento é aquecido e começa a gerar elétrons, que são acelerados pela alta voltagem aplicada. A presença de um cilindro cobrindo o filamento (conhecido como **cilindro de Wehlnet**), envolvido numa atmosfera negativa, com um único ponto de abertura de apenas 2 a 3mm e de um anodo posicionado justamente na direção da abertura, faz com que os elétrons sejam atraídos e direcionados (veja figura 3).

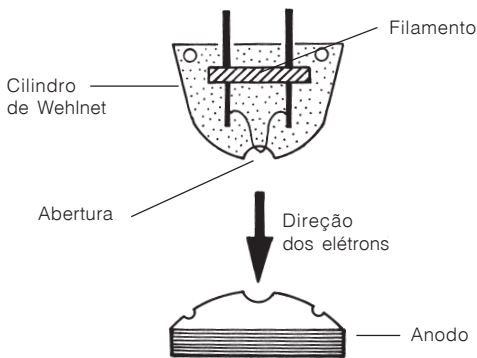


Figura 3: Esquema mostrando o catodo e o anodo do sistema de iluminação do microscópio eletrônico.

O feixe gerado pelo filamento vai produzir uma imagem do material através de uma série de lentes eletromagnéticas. Como elétrons são partículas de pequeníssima massa, até pequenos grãos de poeira no ar bloqueariam sua passagem. Por este motivo, lentes de vidro não teriam utilidade nenhuma. Desta forma, no MET as lentes

são eletromagnéticas e geram campos magnéticos que atraem e posteriormente repelem os elétrons. Quando atraídos por lentes eletromagnéticas, os elétrons assumem trajetórias helicoidais e vão focar a imagem de um espécime colocado antes das lentes num determinado ponto depois de atravessarem a lente. A distância entre o centro da lente e o ponto de convergência dos elétrons é chamada de distância focal das lentes eletromagnéticas. Alterando a corrente nas lentes ou alterando a **aceleração de voltagem**, é possível alterar a distância focal de uma determinada lente eletromagnética, o que na prática fazemos quando focamos a imagem ou alteramos o aumento. Diferente do MO — onde as lentes têm distância focal fixa e precisamos aproximar ou afastar o espécime para focarmos e trocar de lente para obter aumentos —, no MET isto se dá através da mudança na distância focal das lentes fixas.

No sistema de iluminação encontramos as primeiras lentes do ME: são as lentes condensadoras. As lentes condensadoras, têm a função de focar o feixe eletrônico sobre o espécime. Os microscópios atuais apresentam duas lentes condensadoras conhecidas como C1 e C2. O fato de se terem produzido microscópios eletrônicos com duas lentes condensadoras reside na tentativa de se ter um controle maior sobre a iluminação do campo, isto é, iluminar somente a área de observação. Quanto maior o aumento, menor deve ser o diâmetro do *spot* no material e, desta forma, há uma maior concentração de elétrons sobre a área observada (veja acima informações sobre iluminação crítica). **Aberturas** são normalmente encontradas nas lentes condensadoras. Normalmente a abertura em C1 é fixa e em C2 pode ser variável. A utilização de aberturas de diâmetro variável permite ao operador diminuir e aumentar a intensidade do *spot* sobre o material, sem mexer com o diâmetro do *spot*. Por outro lado, aberturas menores tendem a aumentar os efeitos das aberrações, como será discutido mais adiante.

O sistema de manipulação do espécime, também conhecido como **goniômetro**, é composto pelo porta-objeto e acessórios. Dependendo do tipo de porta-objeto, 1 ou 2 **grades** podem ser observadas, sem necessidade de se retirar a peça do microscópio. Os porta-objetos normalmente permitem a movimentação do espécime nos eixos X e Y, mas para atividades mais específicas existem mecanismos que permitem

giros de até 360 graus e diversos graus de inclinação, além de movimento no eixo Z. Outros modelos de porta-objetos podem ser resfriados para observação de material congelado e outros ainda podem ser feitos de um material específico, para não influenciar nas avaliações por **microanálise**.

O sistema de iluminação inclui as lentes objetivas, intermediária e projetoras. Este sistema é responsável pela geração da imagem, pelo aumento e pela projeção da imagem na tela fosforescente ou no filme fotográfico. Tal como na microscopia de luz, também em MET as lentes objetivas são as mais importantes, pois formam a imagem inicial do material que será depois aumentada e projetada pelas outras lentes. Em função de sua importância, devem ser mantidas livres de imperfeições e sujeiras. Para auxiliar nessa tarefa, a maior parte dos MET apresenta uma peça conhecida como **anticontaminador**. O anticontaminador é formado por uma “corda” de cobre que, resfriada por nitrogênio líquido, congela uma peça metálica que fica bem próxima ao objeto. Desta forma, as sujeiras introduzidas pelo porta-objeto ficam aderidas a essa peça resfriada. Na objetiva também encontramos aberturas. Estas geralmente variam de diâmetro (normalmente 30, 60 e 90 μm) e têm como função principal aumentar o contraste do material. Por outro lado, como acontece em fotografia, a diminuição do diafragma da lente tende a aumentar a profundidade de foco. O mesmo ocorre então com a abertura na objetiva. Quanto menor a abertura, maior será a espessura do espécime que estará em foco. Além das lentes objetivas, o sistema de imagem do MET apresenta lentes intermediárias e projetoras. As lentes intermediárias e projetoras têm como principal função auxiliar as lentes objetivas na produção de aumento.

Convém agora discutir um pouco o aumento em MET. Em microscopia de luz, foi visto que o aumento de um determinado sistema pode ser dado através da relação entre o limite de resolução do olho pelo limite de resolução do microscópio (capítulo 2). No caso do microscópio de luz, o limite de resolução, como vimos, era de aproximadamente 1.000X. Usando aquela mesma fórmula, poderíamos imaginar que o microscópio eletrônico, com sua resolução máxima de 0.2nm, poderia alcançar o aumento de 1.000.000X ou mil vezes maior

que o do MO. Na prática, em função da diminuição na iluminação, de imperfeições nas lentes e outros problemas, o limite real está em torno de 300.000X para o MET.

Por fim temos a tela de observação e a câmera fotográfica. A imagem projetada pelas lentes sensibiliza uma tela fosforescente, que transforma os elétrons invisíveis ao olho humano em fótons, os quais podem ser observados diretamente ou através de uma binocular. Alternativamente, chapas fotográficas (as quais passaram por um pré-vácuo, para a retirada de umidade) são colocadas na câmera fotográfica, localizada abaixo da tela fosforescente.

O microscópio é mantido em alto vácuo por um sistema geralmente formado por uma **bomba rotatória** e uma **bomba difusora**. As duas funcionam seguidamente para se atingir o vácuo satisfatório entre 10^{-4} e 10^{-7} Pa.

Da mesma forma que encontramos aberrações nas lentes do microscópio óptico, encontramos aberrações associadas às lentes dos microscópios eletrônicos. Uma aberração comum observada em ME é o **astigmatismo**. Este problema acontece quando o campo eletromagnético de uma lente não está homogêneo, isto é, está mais forte de um lado e mais fraco de outro. Desta forma um ponto do objeto não vai ser representado, após passar pela lente como um ponto, e sim com forma algo elíptica. As causas do astigmatismo podem ser várias, desde sujeira nas aberturas e lentes até problemas na própria fabricação das mesmas. A correção do astigmatismo se faz através da aplicação de corrente em determinada posição para compensar a assimetria do campo eletromagnético. **Aberrações cromáticas** também acontecem em ME e resultam da convergência de raios ou elétrons em diferentes planos focais. Em lentes eletromagnéticas, os elétrons de menor comprimento de onda e os mais energéticos tendem a focar com distâncias maiores que aqueles de comprimento de onda maior e menos energéticos. O resultado prático da aberração cromática é uma diminuição na resolução. A correção dessa aberração em ME se faz através da estabilização da aceleração de voltagem — com a consequente produção de elétrons de mesma energia —, e da manutenção de um bom vácuo, de forma a minimizar a perda de energia dos elétrons, durante seu percurso na

coluna. Em microscopia eletrônica, também podemos observar **aberrações esféricas**; da mesma forma como ocorrem na microscopia de luz, os raios que passam pela periferia das lentes tendem a focar em planos diferentes daqueles que cruzam as lentes pelo centro. As aberrações esféricas em ME podem ser corrigidas através da utilização de aberturas, as quais bloqueariam os raios mais periféricos; por outro lado, essas aberturas diminuem a resolução do sistema⁴. Em microscopia eletrônica, obtemos uma grande resolução, pois utilizamos elétrons, os quais apresentam comprimentos de onda muito pequenos em comparação ao comprimento de onda dos raios visíveis. O comprimento de onda dos elétrons pode ser obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\lambda = h/mv$$

Onde λ é o comprimento de onda, m é a massa do elétron, v é a velocidade do elétron e h é a constante de Planck (6.626×10^{-23} ergs/sec). Em termos práticos, quanto maior a aceleração de voltagem, menor o comprimento de onda do elétron e maior a resolução (veja nota 4), como mostra a tabela abaixo:

Aceleração de Voltagem KV	Comprimento de Onda A ⁰	Resolução em A ⁰ (1A = 0,1 mm)
50	0.054	2.1
100	0.037	1.7
1000	0.009	0.7

A resolução aproximada que os ME podem alcançar na prática é de 0.1/ 0.2nm, em função das limitações decorrentes das aberrações

⁴ O raio do *disco de Airy*, que em outras palavras determina a resolução do sistema, pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$r = \frac{0.61\lambda}{n(\sin a)}$$

Onde r (é o raio do disco), λ é o comprimento de onda do raio luminoso, n é o índice de refração do meio e a é o ângulo de abertura das lentes. Daí, quanto menor o comprimento de onda e maior o ângulo de abertura, maior será a resolução.

comentadas acima. Além da resolução em microscopia, outros fatores são de extrema importância, dentre eles o contraste. Contraste em ME é função da natureza do espécime e dos ajustes feitos no microscópio. De uma maneira geral, o contraste de um determinado material decorre dos elementos atômicos que possui, conseqüentemente da interação dos elétrons com estes elementos. A utilização de metais pesados junto ao material cria um contraste artificial, pois os núcleos mais pesados desses elementos tendem a desviar mais os elétrons do que materiais mais leves, como os normalmente encontrados no material biológico. O contraste do sistema também pode ser aumentado através da diminuição da voltagem, tornando os elétrons menos energéticos e com poder de penetração menor, e também através da diminuição da abertura da lente objetiva. Em relação à diminuição da voltagem, devemos ficar atentos à diminuição conseqüente da resolução do sistema. Por outro lado, a diminuição da abertura tende a diminuir a intensidade do feixe incidente.

O Microscópio Eletrônico de Varredura



*Microscópio de Varredura LEO VP 1450.
Imagem gentilmente cedida pela LEO - Electron Microscopy.*

Outro tipo de microscópio de muito uso é o microscópio eletrônico de varredura (MEV). Diferentemente do MET, onde o material para ser observado deve ser cortado em fatias muito finas ou visto muito grosseiramente por **contrastação negativa**, no MEV o material pode ser observado por inteiro, e sua superfície revelada. No MEV o feixe de elétrons é focado, através das lentes do microscópio, em um pequeno *spot* sobre o material, o qual varre o espécime. Do choque dos elétrons com o material se produz uma série de raios refratados, dentre eles os **elétrons secundários** e os *backscattered*. Esses raios são coletados por detectores, selecionados e processados, produzindo uma imagem do material em um monitor. Como no MET, o MEV pode ser separado em componentes. Estes são: o **sistema óptico**, o **sistema de manipulação do espécime**, **detectores**, **sistema de processamento e apresentação de imagens**. Outros componentes dos MEV são idênticos aos encontrados no MET, como a peça do filamento (*electron gun*), as lentes e o sistema de vácuo, como mostrado na figura 4.

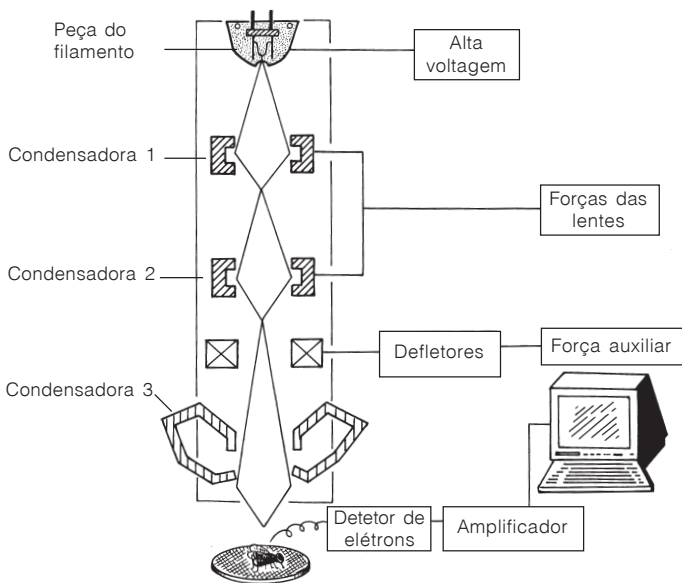


Figura 4: Organização geral do microscópio eletrônico de varredura.

No MEV, o *spot* gerado na peça do filamento percorre de duas a três lentes condensadoras, produzindo por fim um *spot* bem pequeno. As lentes condensadoras, assim como no MET, são conhecidas como C1, C2 e C3 — esta última também acabou conhecida como lente objetiva do varredura. C1 e C2 trabalham para produzir *spots* bem pequenos e controlar a passagem de elétrons, o que produz uma imagem com maior resolução, porém com diminuição do sinal, como veremos mais adiante. Aberturas são colocadas nessas lentes para auxiliar na diminuição do diâmetro do *spot* e também para reduzir a aberração esférica, através da exclusão dos elétrons mais periféricos. As últimas lentes do MEV, conhecidas também como objetivas, têm o papel de reduzir ainda mais o tamanho do *spot* e focá-lo sobre o material. Essas lentes também apresentam o sistema de geração de varredura, isto é, defletores, que vão produzir a varredura do *spot* sobre o material. Essa lente geralmente tem aberturas ajustáveis, que são usadas para gerar *spots* menores e menos energéticos.

O espécime normalmente está montado sobre um suporte de metal chamado de *stub*, posicionado na base do microscópio. O sistema de manipulação do espécime no MEV é constituído de uma mesa, a qual pode ser deslocada nos eixos X, Y, Z (altura), além de rodar e inclinar. A movimentação nesses eixos permite ao operador não só posicionar o material de forma adequada, mas também tem grande efeito sobre outros fatores, como aumento, contraste e profundidade de campo.

O sinal gerado pelo choque entre os elétrons e o material é capturado pelo sistema de detectores e de processamento. Cada tipo de sinal gerado pelo espécime é ou pode ser capturado por detectores específicos. Os elétrons secundários⁵, elétrons de baixa energia, são

⁵ Os elétrons secundários são produzidos por camadas finas, pouco profundas, do material; são também conhecidos como elétrons inelásticos e normalmente utilizados nas pesquisas biológicas. Além dos elétrons de baixa energia, são utilizados em MEV os elétrons *backscattered*, os quais são elétrons elásticos de energia similar aos elétrons incidentes. Os elétrons *backscattered*, por sua alta energia, são gerados pelo material em diversas profundidades. Os elétrons *backscattered* produzem um mapa atômico do material, isto é, o contraste gerado neste sistema é o resultado da característica atômica do material. Outras emissões geradas pelo material são calor, raios X e luz.

capturados por detectores, os quais são posicionados em diferentes ângulos. Depois de capturados pelo detector, os elétrons passam por um fotomultiplicador, o qual, como o próprio nome diz, multiplica o sinal inicial para depois mostrá-lo num monitor.

Agora que temos uma idéia da organização do MEV, podemos discutir outros tópicos relevantes, como o aumento, a resolução, **distância de trabalho** e **profundidade de campo**. O aumento em microscopia de varredura é uma relação entre o comprimento varrido pelo feixe de elétrons e o comprimento apresentado no monitor, como é mostrado abaixo:

$$M = \frac{CM}{CS}$$

M = aumento

CM = comprimento do monitor

CS = comprimento do material varrido

Desta forma, uma mudança de aumento é alcançada pela variação do comprimento varrido pelo feixe. Por exemplo, se varremos 10mm do material e este trecho está sendo mostrado no monitor com comprimento de 10cm, o aumento, segundo a fórmula acima, seria de 10X. Da mesma forma se diminuíssemos o trecho varrido para 1µm, o resultado seria algo em torno de 100.000X. No entanto, como já discutimos, não adianta ter aumento se este não vier acompanhado de resolução. A resolução em MEV está ligada diretamente ao diâmetro do *spot*, de varredura, ao *spot* mostrado no monitor ou ao tamanho do *pixel* escolhido (veja mais à frente), ao tamanho do metal usado para recobrir o espécime, que na prática limita o *spot* para algo em torno de 20nm e também pela velocidade de varredura. De maneira geral, quanto menor o *spot* focado sobre o material e mais lenta for a varredura, mais detalhes serão gerados. Por outro lado, quanto menor o *spot* mais fraco será o sinal produzido, pois menos elétrons atingem o material (veja tabela abaixo).

Diâmetro do Spot nm	1	100	500
Resolução	Melhor	—————▶	Pior
Sinal	Pior	—————▶	Melhor

Outro aspecto importante é a profundidade de campo. Na microscopia de varredura, assim como foi visto em MET, a utilização de aberturas menores nas lentes objetivas gera profundidades de campo maiores. No MEV, essa profundidade também é afetada pela distância entre o objeto e as lentes objetivas. Esta distância é conhecida como distância de trabalho. Como apresentado na figura 5, o aumento na distância de trabalho aumenta também a profundidade de campo e a diminuição na distância tende a reduzir a profundidade de campo.

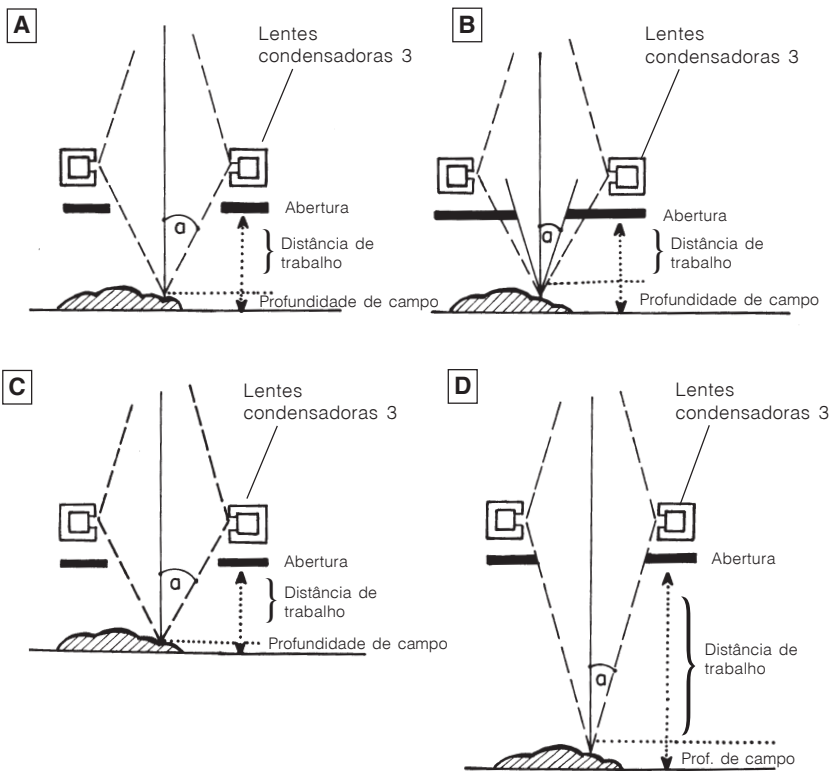


Figura 5: Relações entre abertura, profundidade de campo e distância de trabalho em microscopia de varredura. A e B - Diminuindo a abertura aumenta-se a profundidade de campo (B). C e D - Quando a distância de trabalho é aumentada, o ângulo de incidência do feixe diminui (α) e a profundidade de campo aumenta.

Redesenhado a partir de Bozzola e Russell: "Electron Microscopy", 1991.

O **sistema fotográfico** no microscópio de varredura quase sempre é formado por uma câmera fotográfica montada em um *pallet*, isto é, um pequeno monitor de alta resolução. Como acontece com a imagem mostrada no monitor convencional do microscópio, a imagem no *pallet* é formada aos poucos, acompanhando a varredura do espécime pelo feixe de elétrons. Durante esse período, o diafragma (conhecido como *shutter*) da máquina permanece aberto. Dependendo da velocidade de varredura, a obtenção de uma foto pode levar até alguns minutos.

Por fim devemos comentar um pouco o aspecto de “tridimensionalidade” obtido na observação normal no MEV e o microscópio estereoscópico. O aspecto de imagem tridimensional no MEV é decorrente das diferenças de contraste entre as diversas regiões do material quando visto no monitor. O contraste, por sua vez, aparece porque diferentes partes do material geram diferentes quantidades de elétrons secundários. Áreas que geram muito sinal aparecem mais claras no monitor do que áreas que produzem menos elétrons secundários. Em geral a produção de elétrons secundários depende de diversos fatores, sendo os principais: a orientação do material, sua topografia e a inclinação ou não do feixe. Como o detetor geralmente tem um posicionamento lateral, certas regiões do material estarão na área de sombra do detetor, produzindo pouco sinal. Por outro lado, a inclinação do feixe em relação ao material vai fazer com que pontos mais profundos não gerem tanto sinal, ou que parte do sinal gerado por esses pontos acabe por ser reabsorvida ou bloqueada por regiões mais superficiais da amostra. A produção desses sinais, como já dissemos, gera uma imagem que apresenta uma aparência tridimensional. Para se visualizar o verdadeiro aspecto 3D de um material, necessitamos de sistemas apropriados. No MEV podemos gerar uma imagem 3D através da obtenção de duas imagens normais inclinadas. Isto é possível através da inclinação do material ou através da inclinação do feixe. A observação das imagens pode ser feita através da montagem de um **par estereoscópico**, ou através da montagem das imagens por computador e da utilização de óculos especiais.

Nos últimos anos foram desenvolvidos **microscópios de varredura de vácuo variável**, além de avanços, como um novo sistema

de lentes (**gemin**i) e da mais larga utilização de canhão de elétrons por emissão de campo (*Field-emission gun*). A utilização do modo baixo vácuo em microscopia de varredura (MEV) tem possibilitado a observação de várias amostras, sem necessidade de se retirar a água do material e nem torná-lo condutor. Os microscópios de varredura convencionais têm que trabalhar em situação de alto vácuo (10^{-7} a 10^{-4} Torr)⁶, o que torna obrigatórias a eliminação da água da amostra e a preparação, através da metalização de substâncias condutoras, da superfície a ser observada. A utilização de MEV com sistemas de baixo vácuo permite a observação de amostras num estado o mais natural possível. A maioria dos microscópios considerados de baixo vácuo pode permitir situações de vácuo moderado, aproximadamente 2 a 3 Torr (400Pa), vácuo que ainda é grande se comparado ao mínimo necessário para se manter a água em estado líquido (4.6 Torr). Neste aspecto, somente o microscópio conhecido como ambiental é capaz de chegar a situações de baixíssimo vácuo (50 Torr), permitindo observar-se estruturas ainda úmidas. Outro aspecto muito importante é a imagem gerada em baixo vácuo. A maioria das imagens observadas em biologia, por exemplo, foi gerada a partir de elétrons secundários. Nem todos os microscópios de varredura que trabalham em baixo vácuo apresentam detectores para elétron secundário em modo baixo vácuo. De qualquer forma, o ganho de informação nesses microscópios é muito superior àquele dos microscópios convencionais. Outra inovação tecnológica na microscopia de varredura veio do desenvolvimento de novas lentes eletromagnéticas. Nesse novo sistema, conhecido como **gemin**i, a energia nas lentes é mantida constante, independentemente daquela solicitada no canhão, de tal forma que as aberrações associadas às lentes são minimizadas na imagem, produzindo imagens de ótima resolução.

Os sistemas modernos de microscopia, tanto em microscopia de luz quanto eletrônica, estão atualmente se transformando em sistemas digitais. Isto ocorre pela automação dos microscópios — por exemplo, platinas e objetivas motorizadas no microscópio de luz; goniômetro motorizado e sistemas monitorados por computador, nos microscópios

⁶ 1 Torr = 133 Pascal (Pa).

eletrônicos modernos e a produção de imagem digital, como ocorre nos sistemas modernos de microscopia de varredura. Nesses aparelhos, a imagem que é mostrada no monitor já é uma imagem digital, isto é, o sinal do fotomultiplicador é convertido diretamente em números. Para podermos compreender melhor os microscópios modernos, devemos, pois, nos familiarizar com os sistemas de aquisição e processamento de imagem.

Capítulo 5

AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DE IMAGENS



*Sistema de Microscopia e Processamento de Imagem
- Axioplan II Imaging.*

Imagem gentilmente cedida pela Carl Zeiss do Brasil.

Os microscópios modernos quase sempre apresentam dispositivos para adquirir e processar imagens. O equipamento utilizado para transferir as imagens da tela do microscópio ou da ocular para monitores, na microscopia de luz e na eletrônica, é a câmera de vídeo. Os conhecidos sistemas de vídeo-microscopia se desenvolveram a partir de **circuitos fechados de TV (CCTV)**, que até hoje são utilizados como dispositivos de segurança. Diferentemente da **microcinematografia**, onde as imagens ficavam impressas num rolo de filme, os sistemas de circuito fechado de TV permitem a modulação do sinal elétrico. Quando normalmente alteramos o brilho ou o contraste nos nossos televisores modernos, estamos fazendo um tipo de processamento de imagens, chamado de processamento analógico. Os sistemas de circuito fechado permitem essa modulação do sinal, seja alterando-o na própria câmera de vídeo, no monitor ou mais adequadamente, numa caixa que se posiciona entre a câmera de vídeo e o monitor, chamada de processador analógico. Alguns anos atrás, percebeu-se que esses sistemas poderiam ser acoplados aos microscópios, pois além de permitir que várias pessoas observassem imagens ao microscópio ao mesmo tempo, se percebeu também que era possível obter imagens com o máximo de resolução, o que na microscopia de luz significa baixo contraste (veja capítulo 2), e posteriormente aumentar o contraste analogicamente. Atualmente, com o desenvolvimento dos computadores, parte dos processamentos são realizados por esses equipamentos, de tal forma que um microscópio de luz moderno tem o aspecto mostrado na figura 1, na página seguinte.

Como já dissemos, o ponto inicial para a aquisição de imagens é transformar a imagem vista pela tela do MET ou pelas oculares do microscópio de luz num sinal elétrico a ser carregado e manipulado. Os principais dispositivos para este trabalho em MO e MET são as câmeras de vídeo. Basicamente existem dois tipos de câmeras de vídeo: as câmeras de **tubo** e as câmeras **CCD**. As câmeras de tubo foram as primeiras a ser desenvolvidas e ainda são largamente comercializadas. Esses dispositivos apresentam um tubo fotoelétrico, onde a imagem é projetada num alvo fotossensível que varia de tipo e sensibilidade, e, através da varredura de um feixe de elétrons, é convertida em um sinal eletromagnético.

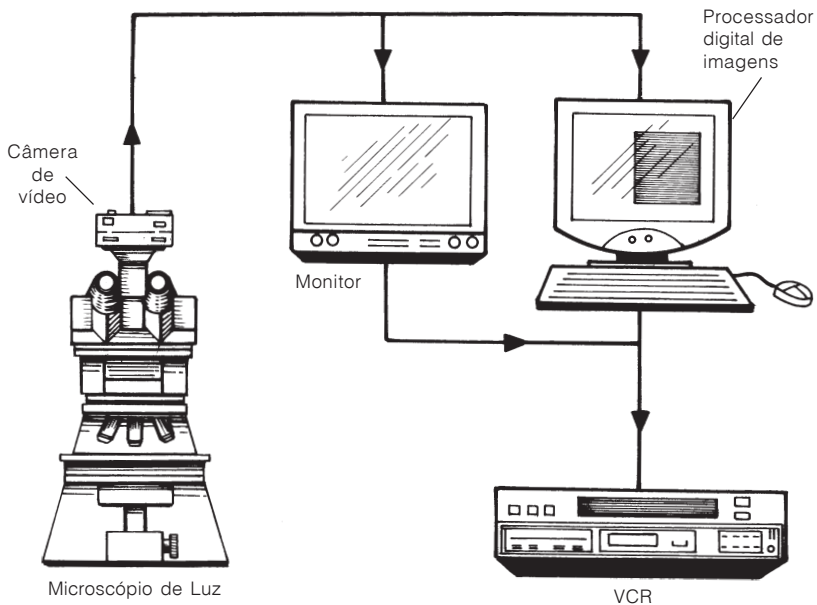


Figura 1: Esquema geral de um vídeo-microscópio e seus acessórios

Além de pesadas e caras, as câmeras de tubo apresentam um baixo *dynamic range*, o que significa que têm sensibilidade limitada a uma determinada faixa de intensidade. Outra desvantagem das câmeras de tubo está na **relação sinal/ruído**, que é baixa. Para determinados tipos de aplicação, foram desenvolvidas as câmeras com **intensificador**, como as **ISIT** (*intensified silicon intensified target*). De qualquer forma, as câmeras de tubo continuam apresentando uma baixa qualidade de imagem e também problemas de distorção do campo, já que o alvo e o tubo apresentam-se em curvatura. A grande revolução nos sistemas de vídeo se deu com o desenvolvimento das câmeras CCD (*charged-coupled device*). Essas câmeras apresentam um *chip* fotossensível no lugar dos tubos de imagem. A primeira e óbvia vantagem deste sistema é a diminuição no tamanho e no peso das câmeras. Além disso, por ser um peça quadrada e reta, não existe mais o problema de curvatura apresentado pelas equivalentes de tubo. As câmeras CCD também podem apresentar um *dynamic range* grande; muitas vezes pode-se usar

a mesma câmera para diversos tipos de microscopia. A relação sinal/ruído também melhorou muito, principalmente nas câmeras onde o *chip* é resfriado (*cooled devices*), onde a **corrente do escuro** gerada pela emissão espontânea nos *chips* é reduzida. Por fim, se fizermos uma comparação de preço e qualidade entre as câmeras de tubo e CCD, veremos que é muito mais vantajoso comprar as câmeras CCD. No caso das CCD deve-se levar em conta, também, a malha fotossensível do *chip*. O *chip* é formado por pequenas unidades fotossensíveis conhecidas como *pixels* (*picture element*). Quanto maior o número de *pixels* e o tamanho do *chip*, mais cara é a câmera e também melhor a resolução obtida.

As câmeras de vídeo ainda podem ser monocromáticas ou coloridas, dependendo da função. O sinal gerado pela câmera pode ser composto ou codificado (**PAL-M**, **PAL-G**, **NTSC**)⁷, em canais separados, como o **RGB**, ou ainda serem câmeras digitais, onde o sinal é digitalizado na própria câmera. As câmeras de **sinal composto** são as mais comuns e tendem a ter a desvantagem de não apresentar fidelidade de cores e ter um tamanho fixo de quadro — por exemplo, 640X480, no caso do modo NTSC —, o que significa resolução limitada. As câmeras com três *chips* são capazes de gerar um sinal para cada comprimento de onda: R (de vermelho), G (de verde) e B (de azul), o que na prática significa maior fidelidade às cores. As **câmeras digitais** apresentam a vantagem de não terem grandes limitações de resolução, como acontece nas câmeras de sinal codificado; por outro lado, geralmente não apresentam imagens em **tempo real**, isto é, são lentas.

O sinal gerado pelas câmeras de vídeo são carregados por cabos e podem ser apresentados em monitores⁸, sendo de grande importân-

⁷ Esses códigos diferem de país para país e estão relacionados à codificação de cores. Nos EUA, o código é o NTSC, o qual também é usado aqui nos filmes de locadora, por exemplo. O sistema de TV brasileiro, no entanto, é o PAL-M, que também é diferente do europeu, que é o PAL-G.

⁸ Os monitores devem ter entradas e sincronia para as câmeras que estão sendo utilizadas. Caso o sinal seja NTSC, o monitor deve ter entrada e poder receber este sinal. O mesmo se aplica para o sinal RGB: o monitor deve ter entradas separadas para cada canal. Já as câmeras digitais normalmente não podem ser associadas a monitores analógicos.

cia a presença de um processador analógico no caminho do sinal. Como já ressaltamos, o processador analógico é capaz de alterar valores de contraste e brilho, melhorando a qualidade do sinal⁹. Para a armazenagem das imagens analógicas, podemos utilizar videocassetes ou, num futuro próximo, um gravador digital de imagens, o qual terá um conversor analógico-digital. Uma solução barata e que também apresenta bons resultados é o videocassete **SVHS**. Antes de falarmos da diferença entre o VHS normal e o SVHS, devemos considerar resolução em nível de sinal de TV. Em TV, **resolução** se traduz no número de faixas pretas e brancas que podem ser apresentadas horizontalmente ou verticalmente. O que na prática significa que, quanto maior o número de linhas de varredura (lembre-se das câmeras de tubo), maior será a resolução. As melhores TVs apresentam 800-1.200 linhas de resolução, os videocassetes comuns algo em torno de 240 linhas e os SVHS têm resolução em torno de 420 linhas. As câmeras de uso comum geralmente entregam um sinal com aproximadamente 400 linhas de resolução. Desta forma, a utilização de SVHS não ocasiona grandes perdas de resolução no armazenamento das imagens.

Em microscopia, devemos nos preocupar em manter um sistema ajustado para que não ocorra muita perda de resolução entre as partes. A utilização de uma boa objetiva em um microscópio de luz vai produzir uma imagem de alta qualidade, que será projetada na câmera de vídeo. Normalmente, quando queremos ter certeza de não perder resolução nesta passagem, devemos ter em mente que, quanto menor o aumento, maior deve ser a resolução do sistema de vídeo, para se poder transferir os detalhes com perfeição. Desta forma, é sempre interessante utilizar uma boa objetiva e uma lente intermediária, antes de projetar a imagem sobre o alvo da câmera. Uma lente intermediária aumenta a imagem sem aumentar a resolução, adequando-se melhor à limitada resolução dos sistemas de vídeo.

Os equipamentos modernos de processamento de imagens contam ainda com sistemas digitais. Estes sistemas normalmente são for-

⁹ Não devemos alterar os valores de brilho e contraste do monitor. Estes devem ser ajustados com uma imagem padrão e não devem ser alterados, com risco de perdermos a noção real de como a imagem está sendo gerada pela câmera.

mados pelas partes físicas (*hardware*) e os programas (*software*). O *hardware* é composto de um computador de boa velocidade e com grande memória de disco e memória temporária (RAM). Além das partes comuns a qualquer computador, quando trabalhamos com câmeras de vídeo que não são digitais devemos ter uma outra peça acoplada ao nosso computador, que é conhecida como *frame grabber*. O *frame grabber* é a placa responsável pela conversão do sinal analógico carreado por cabos vindos da câmera ou do videocassete, ou até do monitor analógico, em uma série de dígitos, processo conhecido como digitalização de imagens. No caso das câmeras digitais, o processo de digitalização ocorre a partir do próprio *chip*, sendo transferido diretamente para o computador, daí não haver necessidade de uma placa específica. A qualidade de um *frame grabber* está na velocidade de digitalização, na capacidade de trabalhar com diversos tipos de sinais (videocomposto, RGB) e, evidentemente, na resolução da imagem produzida. A resolução em imagem digital se traduz no número de “blocos” ou unidades de que a imagem é formada. Quando um sinal chega no *frame grabber*, esse sinal é transformado em números, sendo que as informações armazenadas estão ligadas à posição inicial do ponto na imagem, aos valores de cinza da imagem (brilho/contraste), normalmente entre 0 e 255, e às cores, caso estas estejam presentes. Então a imagem inicial é fragmentada em vários blocos, cada um com suas coordenadas e valores de cinza. Estas unidades também são conhecidas como *pixels* (figura 2).

Quanto maior é a malha, isto é, quanto mais *pixels* tem uma imagem digital, melhor é a sua resolução. Podemos ter uma imagem formada por uma malha de 256X256, 512X512, 1024X1024, ou por outros valores. Normalmente os *frame-grabbers* mais baratos e aqueles preparados para trabalhar com câmeras codificadas, que também são as mais comuns, produzem apenas malhas com resolução de 640X480 *pixels*, que também é o tamanho do quadro no modo NTSC. A taxa de transferência do sinal entre a placa e o computador é realmente um fator limitante de sua aplicação. As placas de aquisição de imagem atualmente comercializadas não têm muita memória própria, o que acaba por confinar a aquisição de imagens a uma de cada vez. Em

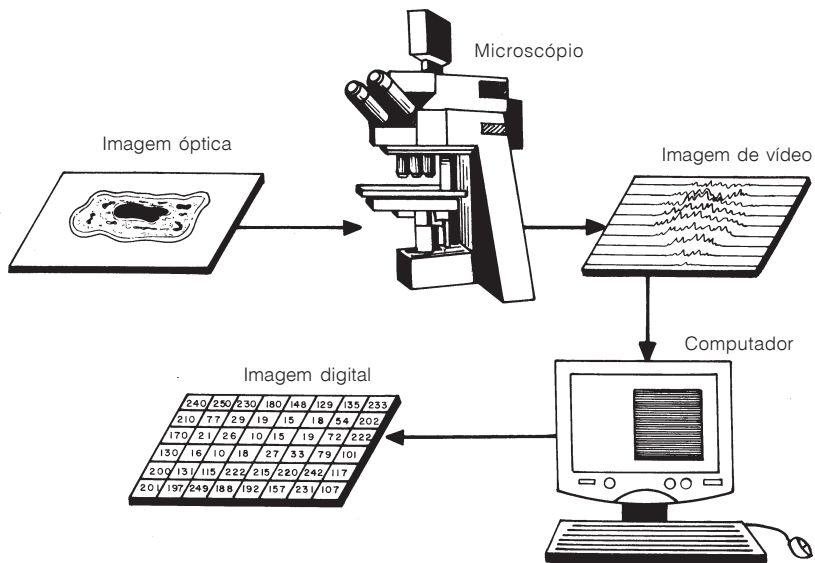


Figura 3: Etapas no processo de digitalização de imagens.

outras palavras, a taxa de transferência de vídeo, a qual chamamos de tempo real, que é de 30 quadros por segundo no modo NTSC, não é acompanhada pela placa de aquisição. Normalmente as placas são capazes de congelar um quadro por vez, e se tivermos, por exemplo, que digitalizar uma seqüência em tempo real, teremos primeiro que gravar em SVHS, para depois transferir quadro a quadro para o computador. As imagens digitalizadas podem ser binárias (1 bit), onde somente teremos partes pretas ou brancas, com 256 valores de cinza (8 bits), imagens com cor indexada (16 bits) ou ainda imagens de 24 bits com cores verdadeiras (podem ser separadas em RGB).

A imagem digitalizada poderá agora ser manipulada por programas específicos. Em geral, podemos dividir os programas que processam imagem em dois tipos básicos: a) programas gráficos, os quais são idealizados para melhorar imagens digitais, acrescentar textos, setas e outras anotações. Neste grupo encontramos vários programas no mercado, como os da ADOBE (Photoshop), os programas da

COREL, como o Photopaint, e diversos outros comerciais e *sharewares*¹⁰; b) os programas científicos de processamento de imagens, que, além de melhorar visualmente as imagens, são idealizados para retirar delas informações relevantes, criar **histogramas** ou fazer medidas. Neste grupo existem diversos programas comerciais e alguns ótimos programas livres, como o IMAGETOOLS e o PCIMAGE, entre outros. Por fim, as imagens, depois de analisadas, podem ser salvas ou arquivadas. Existem vários **meios de armazenagem de dados**, como disquetes, CDs, e **formatos de armazenagem de imagens**, como o **BMP** e o **TIFF**.

Os sistemas de processamento de imagens são desenhados numa seqüência lógica de trabalho. Normalmente existem itens de rotinas numa seqüência, começando com o grupo de aquisição de imagens e terminando com o grupo de apresentação de dados. Por exemplo: num determinado sistema encontramos as seguintes funções: 1 - **funções de aquisição**; 2 - **funções de imagem**; 3 - **funções gráficas**; 4 - **funções de qualidade**; 5 - **funções morfológicas**; 6 - **funções de transformação**; 7 - **funções de segmentação**; 8 - **funções de medida**; 9 - **funções de avaliação**; 10 - **funções de organização de dados**.

No item aquisição (1) estão as funções relacionadas à preparação do *software* para receber imagens, bem como a escolha da câmera de vídeo, do *frame grabber*, para ajustes do contraste e do brilho em tempo real¹¹. No item imagem (2) estão as funções ligadas ao armazenamento e aquisição, a partir do disco de imagens já digitalizadas, bem como o local ou o endereço no programa onde a imagem deve ser colocada. No item gráfico (3) estão as funções ligadas a desenhos ou *overlays* criados sobre as imagens, como círculos, pontos, letras, bem como as funções ligadas à fusão desses desenhos sobre as imagens ou a extração dos *overlays* das imagens. No item qualidade (4) estão as funções ligadas a melhorar as imagens digitalizadas. Neste grupo

¹⁰ *Shareware* é um programa de domínio público, o qual pode ser obtido através de um contato direto com os idealizadores do programa ou baixado pela Internet, porém sua utilização é limitada, necessitando-se pagar uma taxa para o seu uso contínuo.

¹¹ Desta vez o ajuste de contraste e brilho está sendo feito digitalmente. Porém é sempre melhor ajustar o sinal analógico antes que este seja transferido para o computador.

encontramos vários filtros, que melhoram o contraste da imagem, retiram pequenas imperfeições, trazem a imagem para um melhor foco, revelam as bordas ou realçam as bordas dos objetos nas imagens. Em resumo, melhoram a apresentação, aumentam ou diminuem detalhes das imagens para que sejam analisadas ou sejam retirados como defeitos. No item morfológico (5) estão as funções para erodir, dilatar, abrir ou fechar objetos numa imagem. Em termos práticos, estas funções são muito importantes quando queremos individualizar objetos numa imagem, em que estes podem estar unidos ou, pelo contrário, unir objetos que estão separados, para depois efetuar medidas. No item transformação (6) estão as funções ligadas a alterações geométricas, como rotação, inclinação, entre outras. No item de segmentação (7) estão as funções que vão separar a imagem em dois grupos dos valores de cinza e “binarizar”, isto é, dar valores de branco ou preto para cada grupo. Esta etapa é fundamental para realizarmos medições automáticas, pois as regiões serão individualizadas e reconhecidas pelo sistema. No item medida (8) estão as funções de calibração, as condições para medidas e as várias formas e modos de medida (área, perímetro, comprimento). No item avaliação (9) estão as funções para apresentar os dados das medidas na forma de listas, histogramas e distribuição gráfica. Por fim, o item organização de dados (10), que apresenta funções para criar, modificar, ler e escrever listas de dados, para apresentar, numa forma organizada, as informações referentes a imagens, medidas e resultados.

Vimos então que os sistemas de processamento de imagem apresentam uma seqüência lógica de organização, que começa com a aquisição da imagem, a partir de uma câmera de vídeo e de uma placa de aquisição, seguida de processamentos para melhorar a qualidade visual ou para enfatizar qualquer detalhe da imagem. O bloco seguinte se caracteriza por processamentos para segmentar imagens, seguidos ou precedidos de rotinas para individualizar ou agrupar objetos e, por fim, as medidas e a apresentação dos dados em histogramas e gráficos e sua organização em um banco de dados.

Medidas morfométricas podem ser feitas de uma forma automática ou manual. Normalmente a preparação da imagem, como mostrado

acima, vai permitir a utilização de rotinas automáticas; porém, como é sabido por todas as pessoas que trabalham com estes sistemas, e principalmente no caso de material biológico, onde a forma é muito variável, a utilização de medidas manuais e semi-interativas é sempre mais precisa. Nas medidas manuais, as rotinas de segmentação e morfologia passam a ser dispensáveis, pois os objetos serão reconhecidos e marcados através do *mouse*, pelo operador.

Os sistemas de processamento de imagens são, portanto, largamente utilizados para **morfometria**. Como nem sempre medidas de alguns campos representam informações sobre o todo, outras metodologias devem ser usadas, onde relações matemáticas são utilizadas para definir quantidades volumétricas, no campo de estudo conhecido como **estereologia**.

Capítulo 6

FOTOMICROGRAFIA



*Microscópio Axioplan II com saídas para vídeo e
câmera fotográfica.
Imagem gentilmente cedida pela Carl Zeiss do Brasil.*

Parece um pouco contraditório apresentar um capítulo sobre fotomicrografia, após descrevermos os avanços nas câmeras de vídeo e a sua larga utilização em microscopia. No entanto, e apesar desses avanços na vídeo-microscopia, a utilização de câmeras fotográficas comuns (de filme) ainda está longe de ser abolida. Isto se deve principalmente ao fato de que, para obter uma imagem digital de boa resolução, tenhamos ainda que pagar muito caro pelo equipamento. Além disso, é cada vez mais freqüente observarmos pesquisadores optando por manter bem guardado o negativo daquele material especial ou representativo, para possíveis emergências. A respeito desta última constatação, convém dizer que existem micrografias tiradas há décadas que ainda podem ser utilizadas para a produção de fotos em papel. O mesmo não podemos dizer daqueles arquivos que, após alguns anos ou até mesmo meses, desmagnetizaram, ou pior, daquela série de imagens maravilhosas que estão irremediavelmente confinadas em um **disquete 5^{1/4}**!

A obtenção de uma boa fotomicrografia começa, evidentemente, a partir do bom ajuste do microscópio e, particularmente em microscopia de luz, do ajuste da iluminação. Ao contrário da vídeo-microscopia, nos sistemas fotográficos não temos a possibilidade de fazer grandes ajustes analógicos na imagem, antes de adquiri-la.

A maior parte das informações apresentadas a seguir se referem à microscopia de luz. Quando for necessário, será feita a referência à microscopia eletrônica.

Os sistemas de fotomicroscopia modernos são compostos de máquina fotográfica, normalmente automática, e **fotômetro**. As máquinas fotográficas devem estar em caminhos ópticos independentes daqueles das oculares. Isto é, o ideal é que o microscópio tenha uma saída trinocular (2 saídas oculares e 1 para sistema de vídeo ou fotografia), e que de preferência, em uma determinada situação, toda a luz possa ser direcionada para o sistema fotográfico. Para se obter a melhor situação de iluminação na fotomicroscopia, devemos, depois de realizar o ajuste para iluminação de *Köhler*, fechar o diafragma de campo o suficiente para que ele cubra somente a área de interesse, isto é, até que ele não seja mais visualizado no campo a ser fotografado. Esta

operação evita a entrada de **luz parasita** e a degradação da imagem. Precisamos ajustar também o contraste e a resolução do sistema, abrindo ou fechando o diafragma do condensador. Na realidade, a experiência do operador e a sensibilidade do filme ditarão o montante de contraste ou resolução que terá de ser aplicado.

Nas fotomicrografias em preto e branco, podemos utilizar filmes de **ASA** variável. Os filmes de ASA menor, por exemplo, 32 ASA, são de menor sensibilidade e mais contraste; os filmes de ASA maior, por exemplo, 400 ASA, são de alta sensibilidade, normalmente utilizados em situações de baixa intensidade de luz, como na **microscopia de fluorescência** (veja capítulo 7). A utilização de filtros é importante. Na fotomicrografia em preto e branco, devemos utilizar filtro verde. A luz verde (550nm), apesar de não oferecer o menor comprimento de onda (a luz azul tem comparativamente menor comprimento de onda), o que produziria uma imagem de melhor resolução, é o comprimento em que geralmente a maior parte das objetivas são corrigidas para as aberrações. Além disso, a luz verde apresenta o comprimento de onda em que os filmes em preto e branco são mais sensíveis.

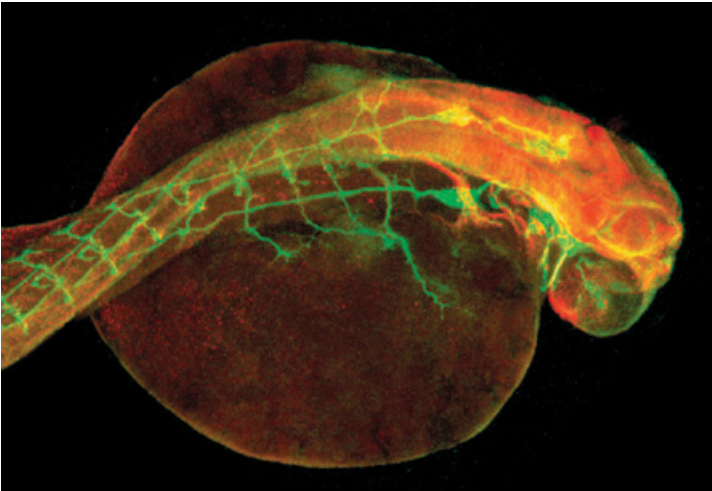
As fotomicrografias coloridas apresentam um grau de dificuldade um pouco maior. Os ajustes no microscópio devem ser os mesmos, com exceção da utilização do filtro verde, como comentaremos mais à frente. Para se obter fidelidade nas cores, primeiro devemos verificar se a voltagem aplicada à lâmpada do microscópio é suficiente para gerar uma luz mais próxima do “branco”. O comportamento da luz na lâmpada do microscópio vai depender da voltagem aplicada. Em uma situação de baixa voltagem, normalmente a luz gerada tem tonalidade avermelhada; com o aumento da voltagem aplicada, a luz torna-se amarela até atingir a tonalidade amarelo-claro, próxima da situação ideal. Caso seja ultrapassada a voltagem ideal, verifica-se a produção de luz com tonalidades azuladas. Para compensar esta pequena variação da luz, para o amarelo, na situação ideal de voltagem, devemos utilizar, no caso da fotomicrografia colorida, um filtro azul.

A boa exposição do filme deve ser feita, independentemente de o filme ser colorido ou preto e branco, ajustando-se a ASA do filme no fotômetro, e se definindo um tempo de exposição. A exposição vai

depender da intensidade da luz que alcança o fotômetro. No caso de a iluminação ter sido ajustada corretamente, o campo deverá estar uniformemente iluminado e a leitura do automático do fotômetro deverá ser seguida. Em casos onde não há uniformidade de iluminação, deve-se aumentar a exposição um pouco acima daquela indicada pelo automático.

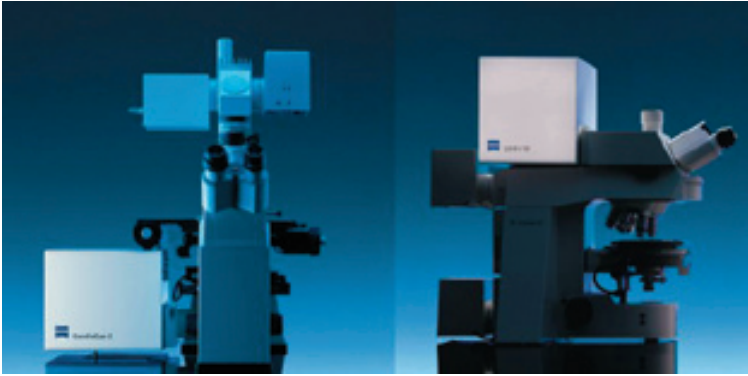
A boa obtenção de micrografias depende fundamentalmente de testes. Tanto em microscopia eletrônica quanto em microscopia de luz, devemos proceder a alguns testes com exposições, filtros e filmes, além de testar modos de revelação. No caso das fotografias coloridas, muitas vezes é prudente utilizarmos filmes para *slide*, obtendo-se a situação ideal de cor. Em seguida, fotografar em filmes convencionais, indicando ao responsável pela ampliação, com o auxílio do *slide*, as cores ideais da fotografia.

SISTEMAS ESPECIAIS
DE MICROSCOPIA



*Imagem confocal de embrião de “Zebrafish”,
Dr. Marx e Dr. Bastmeyer, Univ. Konstanz, galeria
Carl Zeiss.*

Microscopia de Fluorescência e Confocal a Laser



*Microscópios confocais a laser Confocor 2 e LSM 510.
Imagem gentilmente cedida pela Carl Zeiss do Brasil.*

O microscópio confocal a *laser* pode ser considerado o ápice da microscopia de luz. Apesar de a idéia de microscopia confocal ter sido concebida na década de 50, somente com o desenvolvimento de computadores e *lasers* com preços mais acessíveis e de *softwares* adequados para a manipulação dos dados é que esses aparelhos começaram a ser produzidos. Na área biológica, o grande impulso à microscopia confocal começou a partir do final dos anos 80. No Brasil, as primeiras máquinas comerciais começaram a ser apresentadas no início da década seguinte.

A grande diferença entre esses sistemas e os microscópios convencionais está na produção de imagens de extrema nitidez. Isto é particularmente notável naquelas técnicas onde se utiliza microscopia de fluorescência. Neste tipo de microscopia, uma substância conhecida como **fluorocromo** é associada a, por exemplo, um **anticorpo**, e este se ligará ao **antígeno** que se pretende visualizar. Poderíamos usar um anticorpo ligado a um fluorocromo qualquer, e esse anticorpo reconheceria e também se ligaria, por exemplo, à tubulina, uma proteína que faz parte do citoesqueleto das células. Quando excitado por uma luz em um determinado comprimento de onda, este fluorocromo

responde emitindo uma outra luz, cuja cor vai depender do tipo de fluorocromo (veja tabela de exemplos de fluorocromos abaixo).

<i>Fluorocromo</i>	<i>Máxima Absorção</i>	<i>Máxima Emissão</i>	<i>Aplicações</i>
Laranja de Acridina	490	590, 640	Marcação de DNA/RNA
Fluoresceína	496	518	Imunoconjugados
Texas Red	592	610	Imunoconjugados
DAPI	372	456	Marcação de DNA

A vantagem da fluorescência está em se visualizar e se identificar com razoável precisão a localização do antígeno que se pretende estudar. Os problemas ligados a essa observação são a intensidade da luz necessária para excitar o fluorocromo, a vida média deste fluorocromo, bem como a falta de nitidez da imagem gerada. Para explicar ainda melhor, como e por que esses problemas acontecem, precisamos descrever rapidamente o que é **epi-iluminação**. Os microscópios de luz apresentados anteriormente são microscópios de luz transmitida. Isto significa dizer que a luz captada pelas objetivas do microscópio atravessou primeiro o espécime. Caso o material não seja translúcido, como por exemplo na observação de flores e insetos, podemos utilizar o microscópio estereoscópico, também conhecido como Lupa. Existe ainda uma modalidade de microscopia na qual os usuários querem capturar a luz que é emitida ou refletida pelo espécime: é o caso da microscopia de fluorescência. Nesta forma de microscopia, a luz é gerada por uma fonte que está acima (no caso dos microscópios de montagem convencional, não nos invertidos) do plano físico das objetivas. A luz, normalmente gerada por uma lâmpada de **vapor de mercúrio - HBO**, é enviada por uma série de espelhos e condensada pela própria objetiva sobre o material. Neste tipo de microscopia, as objetivas funcionam também como condensadores. A luz então alcança o espécime, ou é refletida por este; ou, no caso da fluorescência, excita um fluorocromo. Neste último caso, como resposta, o fluorocromo também emite uma luz que deverá ser capturada pela própria objetiva do

microscópio. Então, como vimos, na microscopia de fluorescência as objetivas têm papel duplo: servem de condensadores, condensando a luz sobre o espécime e também exercem seu papel como objetivas, capturando a luz emitida pelo espécime. A partir das objetivas, a luz segue o caminho normal para a geração da imagem (veja esquema do microscópio de fluorescência na figura 1, a seguir).

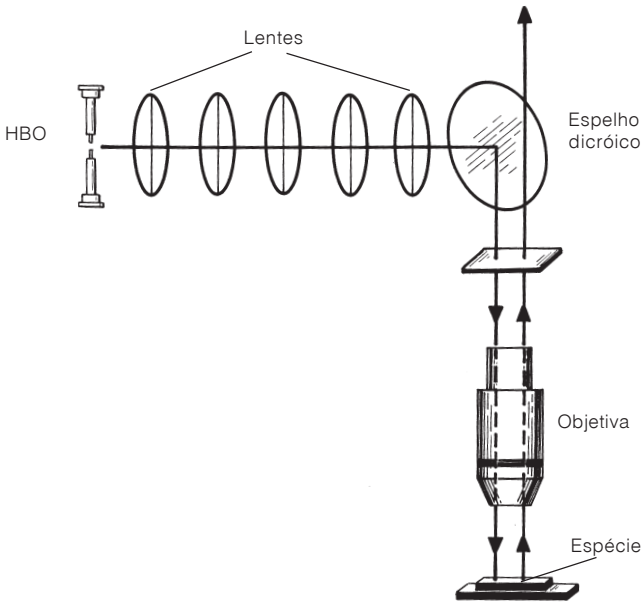


Figura 1: Organização geral e caminho óptico no microscópio de fluorescência.

As vantagens da microscopia confocal a *laser* são, então, mais notáveis naqueles estudos onde se utiliza a epi-iluminação. Na microscopia de fluorescência convencional, a luz capturada pela objetiva vem de um volume do material cuja profundidade é definida pela objetiva utilizada. Isto significa dizer que, por exemplo, a fluorescência capturada pela objetiva, no caso apresentado acima, não veio só da região em foco, mas sofreu interferência das regiões que estão acima e abaixo do plano de foco. Isto vai gerar uma imagem borrada e de pouca nitidez.

Para se contornar esses problemas, algumas estratégias são utilizadas na microscopia confocal. Uma primeira diferença está na iluminação. Os microscópios confocais utilizam *lasers*, que produzem luz em comprimentos de onda bem definidos e com grande intensidade. No modelo de confocal chamado *point scanning illumination*, um ponto de luz, gerado pelo *laser* e transmitido pela objetiva¹², varre o espécime. O resultado da interação da luz com áreas sucessivas do espécime é armazenado ou recolhido por um foto-detector. Para gerar o ponto que vai varrer o espécime, uma **abertura** é colocada na saída ou próxima à fonte de luz; esta pode ser chamada de abertura de iluminação (*pin-hole*). O ponto gerado pela passagem da luz por esta abertura é então enviada através de um espelho em direção às objetivas. Este **espelho** é **dicróico**, o que significa que ele reflete luz de um determinado comprimento de onda e permite a passagem de luz de outro. No caso apresentado, a luz gerada pelo *laser* e que atravessa a abertura é refletida pelo espelho em direção às objetivas. As objetivas vão, então, focar o ponto de luz sobre o espécime¹³. A varredura desse ponto de luz sobre o espécime vai excitar os fluorocromos ou vai gerar uma **reflexão** (como ocorre, por exemplo, com superfícies metálicas ou revestidas com substâncias que refletem a luz) e este sinal vai seguir o caminho inverso. Primeiro, o sinal gerado pelo material será captado pela mesma objetiva. Em seguida, o sinal atravessa o espelho dicróico e atravessará também uma segunda abertura colocada antes do detector ou fotomultiplicador. Esta segunda abertura é conhecida como abertura confocal, pois é responsável pela confocalidade da imagem. Para entendermos melhor esse esquema, vamos analisar a figura 2.

É muito importante frisar que as aberturas, tanto a da iluminação quanto aquela dita confocal, estão em plano conjugado com o espécime. Esta afirmativa é de extrema importância, pois é a alma do aparelho. A luz gerada em planos que não são exatamente aqueles do

¹² Como vimos em epi-iluminação, as objetivas condensam a luz sobre o espécime. Este ponto é gerado normalmente por uma objetiva de alta abertura numérica.

¹³ A área iluminada pelo ponto no espécime vai ser limitada pela difração que a luz vai sofrer quando atravessar a lente, e é então correspondente à área ocupada pelo disco de Airy (veja nota 4).

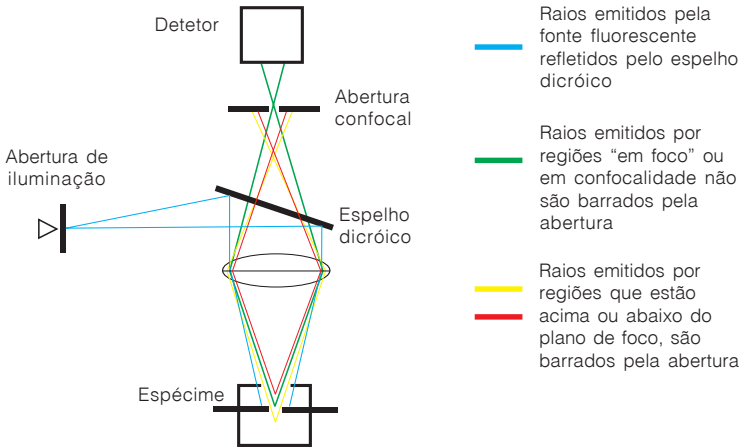


Figura 2: Esquema geral do microscópio confocal.

plano focal observado, e conseqüentemente não vão estar no exato plano conjugado das aberturas, será barrada pela abertura confocal. Desta forma, a luz, que na microscopia de fluorescência é responsável pela criação de um borrão e pela diminuição da nitidez da imagem, é barrada.

As vantagens da microscopia confocal vão muito além da evidente e impressionante melhoria visual na qualidade e nitidez da imagem. O fato de o microscópio confocal apresentar uma melhoria na resolução axial decorre da diminuição da interferência da luz que está fora de foco, permitindo, através do movimento mecânico da platina ou da objetiva do microscópio na profundidade do espécime (plano Z, veja figura 3), obter **cortes ópticos** do material, sem efetivamente ter necessidade de cortar fisicamente o objeto.

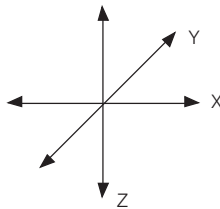


Figura 3: Planos cartesianos no microscópio confocal.

Esses cortes ópticos podem, através de *software* específico, ser remontados e originar um **modelo tridimensional**, o qual vai ser um espelho fiel do volume estudado. Por exemplo, no caso apresentado anteriormente, da proteína tubulina, se quiséssemos traçar a forma e disposição de microtúbulos numa célula usando o confocal, poderíamos obter não só um mapa biplanar, mas uma imagem da distribuição dessas estruturas no plano tridimensional da célula. Os especialistas em confocal afirmam ainda que um pequeno aumento na resolução lateral é obtido com microscópio confocal, também em função do diminuto e coerente ponto de luz formado pelas aberturas. Em termos práticos, a busca da melhor resolução no sistema confocal é limitada pela diminuição de intensidade, quando se utilizam aberturas cada vez menores. Isto significa dizer que sempre existe um compromisso entre a melhor resolução, através do uso de aberturas cada vez menores, e a intensidade do sinal que chega ao detetor, que será cada vez menor, quanto menor for a abertura utilizada.

É evidente que o microscópio confocal é um instrumento surpreendente e que as imagens obtidas principalmente em fluorescência são infinitamente superiores àquelas do microscópio de luz convencional. Além disso, pode-se observar por reflexão a superfície de estruturas, o que é de grande importância para aplicações industriais. No entanto, existem ainda algumas limitações. A qualidade da imagem gerada, por exemplo, é ainda dependente do tempo de aquisição. Isto significa que, para se obter uma imagem com boa resolução, há necessidade de se realizar uma varredura lenta na amostra. Isto é de certa forma incompatível com a observação de organismos ou estruturas que se movam com alguma velocidade. Outra limitação está na relação sinal/ruído. Apesar de o confocal ser um ótimo equipamento e de ter uma relação sinal/ruído alta, para alguns tipos de fluorescência de baixa emissão a imagem gerada ainda apresenta algum ruído, a nosso ver, se comparada à mesma imagem obtida por câmeras de vídeo resfriadas e de varredura lenta (*Slow-Scan-Cooled* — CCD). Outro fato também de extrema relevância é a relação custo/benefício deste equipamento. O preço de um microscópio confocal ainda é, se comparado a um similar convencional, aproximadamente seis vezes superior. Para se

justificar um investimento nessa ordem, atualmente em torno de 200 mil dólares, seria necessária uma utilização em larga escala do aparelho. Em áreas biológicas, a não ser para um grande centro de microscopia, a relação custo/benefício ainda é astronômica. O uso ainda limitado do microscópio confocal impede que este aparelho seja um instrumento comum em laboratórios de microscopia. Ainda será necessário o barateamento do custo, principalmente dos *lasers*, para que este microscópio extraordinário venha substituir os microscópios de fluorescência convencionais¹⁴.

Microscopia digital e “Remote-control microscopy”



*Microscópio eletrônico digital LEO OMEGA 922.
Imagem gentilmente cedida por LEO - Electron Microscopy.*

¹⁴ As empresas de microscopia estão produzindo sistemas confocais mais simples, com funções limitadas e preços mais atraentes.

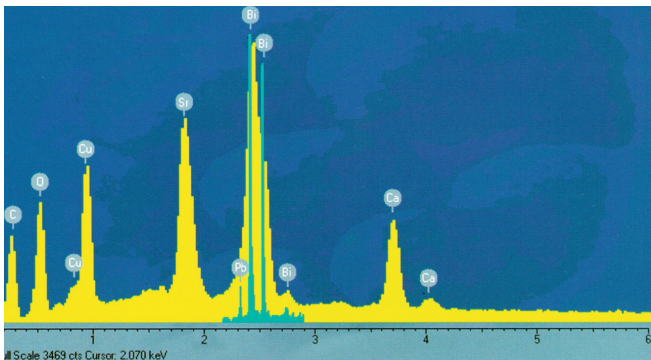
A associação entre computadores e microscópios de luz ou eletrônicos, como foi apresentado anteriormente, é cada vez maior. O microscópio confocal é um exemplo do sucesso dessa associação. Um outro exemplo, bem interessante e cada vez mais em voga, é o que se conhece como **microscopia digital**. Nos microscópios modernos, além do processamento digital de imagens, os computadores estão sendo responsáveis pelo próprio gerenciamento dos equipamentos. Isto é, nos microscópios eletrônicos modernos, sejam eles de transmissão ou de varredura, é cada vez mais freqüente a utilização do computador como interface entre o operador e o aparelho. O mesmo passa a ocorrer com os microscópios de luz. Através de uma tela no Windows, nesses equipamentos o operador pode alterar o aumento, mexer no brilho e contraste, alterar o foco, passear pelo campo observado. Com a interligação de computadores e, mais modernamente, através da Internet, passou a ser possível controlar o microscópio a distância (*remote-control*). Isto significa dizer que poderíamos, sem estar presentes fisicamente à frente do aparelho, controlá-lo a distância. Obviamente, para que isso ocorra, alguém tem de ser responsável pela colocação do material e de certos ajustes que ainda só podem ser efetuados no próprio microscópio. As vantagens de uma telepatologia são enormes. O especialista em determinado tecido ou doença poderia auxiliar um colega no diagnóstico ou trabalhar em conjunto, em cidades, estados e até países diferentes. O mesmo se pode aplicar a pesquisadores e outros usuários.

Apesar dessas vantagens, existem ainda algumas limitações que devem ser observadas. A primeira, e óbvia, está ligada à conexão entre os computadores. Como boa parte das informações transferidas entre os aparelhos são imagens, caso a rede não seja rápida a defasagem entre a imagem gerada pelo microscópio e aquela vista pelo observador remoto é enorme. Para piorar o quadro, há a necessidade da digitalização das imagens que saem dos microscópios, antes, evidentemente, de serem transferidas por rede. Neste caso, a forma mais rápida seria a aquisição do sinal por câmeras de vídeos analógicas e sua conversão por placas digitalizadoras (os *frame grabbers*). Para isto, devemos imaginar que a imagem também deva ser **compactada**. Então, para se adquirir

e transmitir imagens entre computadores, de forma dinâmica, próxima ao tempo real (30 quadros/segundo), faz-se necessária a limitação na resolução de aquisição (sistemas codificados: NTSC, PAL-G) e posterior compactação. O resultado dessa operação é a perda de resolução. Esta perda será tanto maior quanto maiores forem a rapidez e a compactação necessárias. Em termos práticos, podemos observar algo em um microscópio de uma posição remota, porém dificilmente seremos capazes de ver em tempo real, o que significa também que dificilmente controlaremos o aparelho. Em outras palavras, a imagem que nos vai chegar estará, na melhor das hipóteses, alguns segundos atrasada, e qualquer movimento em foco no campo de observação não será efetivo. Os fabricantes comentam que se pode “tentar” trabalhar com um sistema de aquisição rápido, destes citados acima, e, para contornar o problema da resolução, utilizar uma outra câmera de vídeo, que pode ser digital, e adquirir uma imagem estática de alta resolução em alguns segundos ou minutos.

A minha opinião final a respeito destes equipamentos é que, no atual estado de desenvolvimento e velocidade de câmeras, *softwares* e da própria rede, o controle remoto, mesmo que parcial, do microscópio é praticamente impossível.

Espectroscopia e Microanálise em Microscopia Eletrônica



Mapa de elementos obtido por microanálise de raios X.

Além de produzir imagens com alta resolução e aumento, os microscópios eletrônicos podem ser utilizados como ferramentas analíticas. Quando o feixe eletrônico interage com o espécime, vários sinais podem ser gerados (veja figura 4).

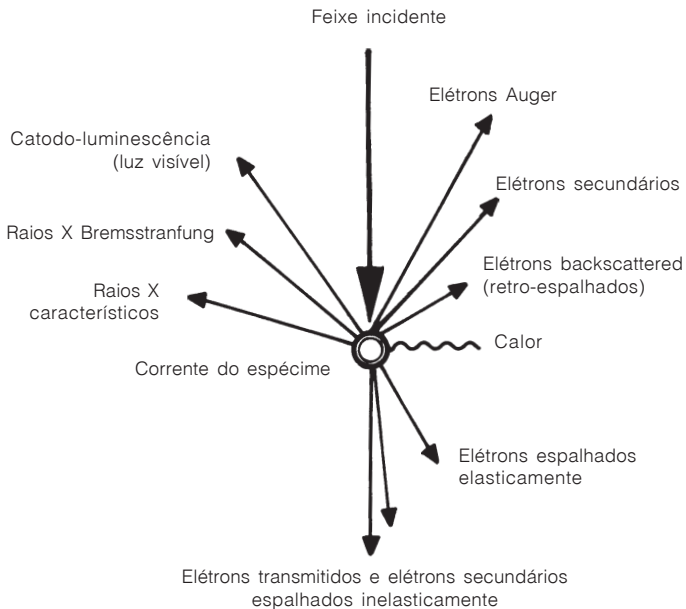


Figura 4: Sinais gerados após a interação do feixe com o espécime.

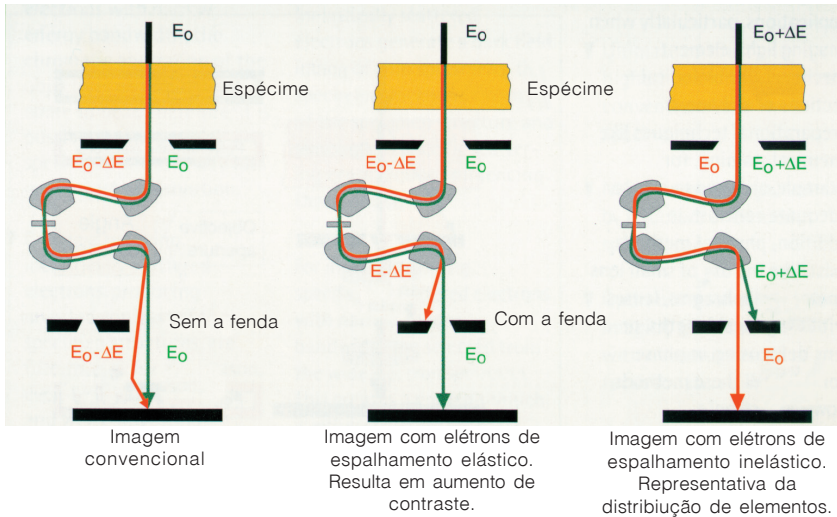
De todos os sinais produzidos na interação do feixe com o material, dois tipos são particularmente importantes em estudos analíticos: **raio X** e os **elétrons de espalhamento inelástico**.

O raio X é gerado quando os elétrons altamente energéticos do feixe interagem com os elétrons das camadas orbitais do átomo. Desta interação, um elétron da camada interna é ejetado, o que causa uma ionização temporária do átomo. A situação é estabilizada com um salto de um elétron de órbita mais externa para o local vago deixado pelo elétron ejetado. Como este elétron vem de uma camada mais externa, necessita perder energia para se acomodar numa camada orbital mais

interna. Esta energia é liberada na forma de raio X. Cada elemento vai apresentar um padrão característico de emissão de raio X, que é dependente do seu número atômico. Isto significa dizer que cada átomo, quando sujeito a este tipo de ionização, vai produzir um padrão de picos de raio X que é único. A análise dos picos gerados pode informar, então, qual ou quais elementos podem ser encontrados na amostra. De forma não tão segura, também se pode averiguar a quantidade relativa de cada elemento na amostra. Para detectar esta radiação, tanto o microscópio de transmissão quanto o de varredura devem estar equipados com os detetores apropriados. Nos estudos de biologia normalmente se utilizam detetores **EDX** - *energy dispersive x-ray detectors*.

A outra forma de se analisar os elementos constantes num material é através da espectroscopia de perda de energia, conhecida como **EELS** (*electron energy loss spectroscopy*). Nesta técnica se utiliza um detetor para analisar e diferenciar a perda de energia dos elétrons de espalhamento inelástico que atravessaram uma amostra bem fina. Cada elemento no material, em função de suas características atômicas, vai ocasionar perda de energia característica nos elétrons do feixe, e podem ser identificados em função disto. Como a detecção dos elétrons por perda de energia é um evento primário, isto é, não é decorrência de um salto orbital, como no caso da microanálise, o EELS apresenta uma eficiência muito superior do que o EDX. O espectrômetro de perda de energia pode ainda ser utilizado como um filtro de energia para aumentar o contraste e resolução das imagens geradas por transmissão em espécimes espessos. Como o espectrômetro é posicionado entre as lentes objetivas e as intermediárias, e filtra elétrons de energias determinadas, pode ser utilizado também para filtrar elétrons que causariam aberrações cromáticas. A grande dificuldade na utilização do EELS para a análise de elementos está na necessidade de se produzir cortes extremamente finos, bem abaixo das dimensões normalmente utilizadas na microscopia convencional. Podemos concluir também, a partir da última afirmativa, que esta técnica só pode ser utilizada em associação com microscópios eletrônicos de transmissão (veja na figura 5, o funcionamento do espectrômetro Ômega, da LEO Electron Microscopy).

Filtro de Energia em Microscopia Eletrônica de Transmissão



E_0 - Elétrons de espalhamento inelástico

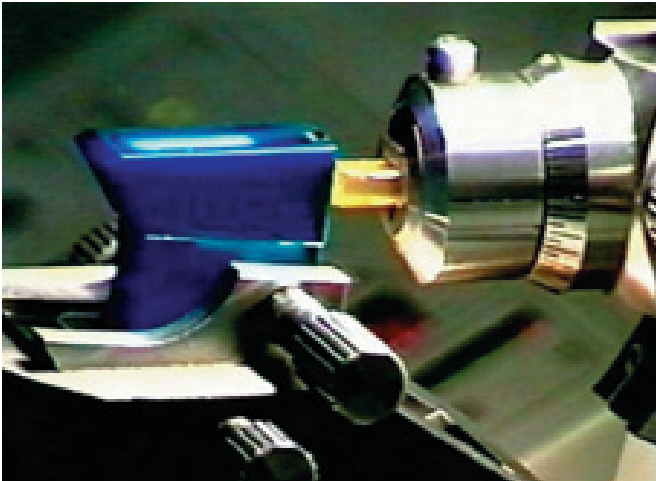
E_0 - Elétrons de espalhamento elástico

Figura 5: Espectrômetro de perda de energia.

Seja qual for a técnica utilizada, microanálise ou espectroscopia, devemos ter em mente que o preparo do material é de extrema importância na veracidade e qualidade dos resultados obtidos. Da grade ou do porta-objeto, à composição dos **tampões** utilizados na preparação do material, tudo pode influir ou mascarar os resultados. Da mesma forma, como vimos na morfometria e no processamento digital de imagens, a utilização do microscópio eletrônico para análises qualitativas e quantitativas da amostra é fascinante, porém requer um trabalho muito sério e criterioso por parte dos operadores.

Capítulo 8

MÉTODOS E EQUIPAMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS EM MICROSCOPIA DE LUZ E ELETRÔNICA



Detalhe do processo de ultramicrotomia para obtenção de cortes ultrafinos para a microscopia eletrônica de transmissão.

O material utilizado tanto para microscopia de luz como para a microscopia eletrônica, caso não seja observado de imediato, tem que ser **fixado** logo após a sua obtenção. O processo de fixação varia um pouco, dependendo do propósito e do equipamento a ser usado para a análise. De maneira geral, o material visualizado em microscopia de luz é fixado em solução de **formaldeído** a 10% em solução tamponante. Já o material observado em microscopia eletrônica é fixado em **glutaraldeído** a 2,5% e **paraformaldeído** a 4%, também em solução tamponante. O material é mantido nessas soluções por períodos que variam de 1 a 24 horas, a 4 °C. Em microscopia eletrônica, a fixação ainda pode ser física, através de congelamento ultra-rápido. Neste último caso o material retém boa parte de suas características normais, sendo observada uma menor quantidade de artefatos. O ponto ainda limitante na utilização do congelamento como técnica de rotina está na necessidade de se utilizar acessórios resfriados no microscópio, além do fato de o corte ou a preparação terem de ser extremamente finos, para se evitar a criação de cristais e conseqüente deterioração da amostra.

Após o processo de lavagem, desidratação e inclusão em **resina** (que também varia se a preparação for para a visualização em microscopia de luz ou eletrônica de transmissão), o material é cortado. Na microscopia de luz, utiliza-se um aparelho conhecido como **micrótomo** (figura 1) e são obtidos cortes com espessura variável, em torno de alguns micrômetros (6-10 μ m).



Figura 1: Técnico trabalhando no micrótomo.

Após o processo de microtomia, o material destinado à microscopia de luz é coletado em uma lâmina, desparafinado e corado (figura 2). A **coloração** mais usada nos estudos histológicos é a **hematoxilina & eosina**, conhecida como H&E. Nessa coloração, o núcleo celular cora-se normalmente em roxo, pela hematoxilina, e o citoplasma em rosa, pela eosina. Após um período de secagem, a lâmina deve ser montada. Sobre o corte se deposita uma gota de bálsamo e posteriormente a lamínula. A lâmina assim está pronta para ser observada em microscópio de luz.

Evidentemente que as observações de material vivo, como protozoários, algas ou células em cultura, dispensam todas as etapas descritas acima, desde que sejam utilizadas algumas das técnicas de contraste em microscopia apresentadas no capítulo 3.



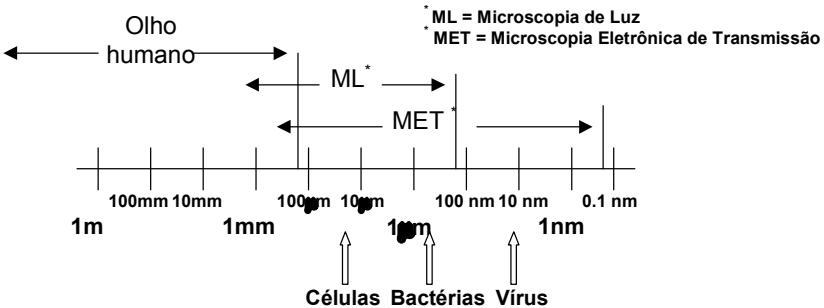
Figura 2: Etapa de coloração das lâminas.

O material a ser observado na microscopia eletrônica de transmissão (MET) também deve ser cortado. O aparelho onde se realiza este trabalho é conhecido como ultramicrotomo (Fig. 3). Os cortes realizados pelo ultramicrotomo são de algumas dezenas de nanômetros ($1\text{nm} = 10^{-6}\text{mm}$) para que possam ser atravessados pelo feixe eletrônico e observados ao MET (ver Tabela 1). O material cortado pelo ultramicrotomo é coletado em pequeníssimas grades e deve ser **contrastado** antes de ser observado. Para este fim, utilizam-se substâncias

contendo metais de grande número atômico, como chumbo, urânio e ósmio. Como já foi apresentado anteriormente, as imagens em microscopia eletrônica são monocromáticas (tons de cinza). A visualização de um material e seu contraste fica, então, na dependência do número atômico dos elementos da amostra. Isto é, o contraste produzido na tela fosforescente do microscópio é o resultado da passagem do feixe pela amostra, onde vários elétrons são desviados, refletidos ou perdem energia, enquanto outros passam com menor interferência. Quanto maior for o número atômico do elemento na amostra, maior será a interferência deste no feixe, menos elétrons chegarão à tela e menor será a fosforescência emitida. Por exemplo, o **tetróxido de ósmio** se liga com muita afinidade aos fosfolipídios das membranas celulares. Quando utilizado na pós-fixação, faz com que a membrana apareça escura, bem delimitada. Caso não utilizemos o tetróxido, as membranas desviam poucos elétrons e conseqüentemente ficam com pouco contraste e mal são distinguidas do fundo.

Tabela 1

Escala de potências de resolução do olho ao microscópio eletrônico



O material, depois de cortado e contrastado, está pronto para ser observado ao microscópio. Por outro lado, em microscopia eletrônica de transmissão também se pode observar o material sem haver necessidade de cortá-lo, no método conhecido como contrastação negativa. Nesta metodologia, o material é depositado diretamente



Figura 3: Cortes ultrafinos obtidos no ultramicrotomo.

sobre uma grade recoberta com uma película, a qual serve de sustentação, evitando que o material escoe através dos furos da grade. Em contrapartida à rapidez e facilidade do método, tem-se que levar em consideração que a imagem dificilmente revelará grandes detalhes da amostra.

Alternativamente, se o objetivo é a observação em microscopia de varredura, não há necessidade de se cortar o material, visto que, nesse modo de microscopia, os elétrons utilizados são aqueles que foram “refletidos” pela amostra. Na microscopia de varredura convencional, isto é, com alto vácuo, o material deve ser seco e receber uma cobertura de ouro antes de ser observado. Para se retirar toda a água do material, sem que haja grande alteração na forma, utiliza-se um aparelho chamado **ponto-crítico**. Posteriormente, o material deve passar pelo **metalizador**, para receber uma camada de material condutor. Nos modernos microscópios de baixo vácuo (capítulo 4), não há mais necessidade de se desidratar nem metalizar o espécime, reduzindo os artefatos possivelmente introduzidos nessas etapas.

A preparação de material para a microscopia é, como vimos, fundamental para a boa obtenção das imagens. Por outro lado, quanto maiores as etapas e substâncias químicas utilizadas na preparação, mais distante da situação *in vivo* o espécime estará. Desta forma deve-se sempre procurar preservar o material de estudo, através da busca da

metodologia mais adequada para cada amostra, criando assim o mínimo de alterações ou de artefatos.

Outras técnicas, como a **imunocitoquímica**, **citoquímica enzimática** e **auto-radiografia**, são também de extrema importância, e, associadas à microscopia de luz ou eletrônica, permitem a identificação ou caracterização de células, organelas ou moléculas.

PEQUENO DICIONÁRIO DE MICROSCOPIA

Apesar de ser um livro introdutório sobre técnicas e equipamentos em microscopia, discorreremos sobre assuntos diversos que apresentam uma terminologia própria e muitas vezes confusa. Em função disto, resolvemos preparar um pequeno dicionário de microscopia e afins, para que sirva de fonte de consulta rápida sobre os diversos assuntos tratados neste manual.

Aberração – É a incapacidade de uma lente óptica ou eletrônica produzir uma exata correspondência geométrica do objeto observado ou a produção de defeitos ou alteração de cores causadas à imagem após atravessarem a lente.

Aberrações cromáticas – Aberrações que ocorrem em função da maior refração de ondas com comprimento de onda menor em relação às outras de comprimento de onda maior, causando franjas coloridas na imagem.

Aberrações cromáticas em ME – Estas aberrações acontecem porque elétrons mais energéticos, com comprimento de onda me-

nor, tendem a focar em pontos mais distantes daqueles de comprimento de onda maior e menos energéticos, causando uma diminuição na resolução do sistema.

Aberrações esféricas – Estas aberrações ocorrem porque os raios que percorrem as regiões periféricas de determinadas lentes tendem a focar antes dos raios que percorrem regiões mais centrais.

Aberrações Esféricas em ME – Da mesma forma que acontece com a microscopia de luz, em microscopia eletrônica os raios que passam pela periferia das lentes tendem a focar em planos diferentes daqueles que cruzam as lentes pelo centro. A utilização de aber-

turas minimiza o problema; por outro lado, vão filtrar raios importantes para a resolução da imagem.

Aberturas em ME – As aberturas em microscopia eletrônica podem ser encontradas junto às lentes. As aberturas nas lentes condensadoras têm a função de regular a intensidade do *spot*, quando utilizadas aberturas mais largas e a diminuição da aberração esférica com a utilização de aberturas menores. Na lente objetiva as aberturas têm a função de aumentar o contraste; quanto menor for a abertura, maior o contraste. Também a diminuição da abertura junto à lente objetiva tem como consequência o aumento da profundidade de campo, isto é, aumenta a “espessura” do corte que fica em foco em uma determinada situação.

Aberturas em microscopia confocal – As aberturas, também conhecidas como *pin-holes*, são normalmente duas: a abertura de iluminação, localizada próxima à saída do *laser*, e a abertura confocal, localizada antes do detector (veja também **Microscopia confocal a laser**).

Abertura numérica – Conhecida também como NA das lentes (*numerical aperture*), é a capacidade de uma determinada lente acolher ou receber o cone de luz

espalhado e transmitido pelo objeto. Em termos matemáticos, é o seno do ângulo do cone de luz que vai para a objetiva multiplicado pelo índice de refração do meio entre o espécime e a lente.

Aceleração de Voltagem – As alterações na voltagem do microscópio eletrônico, de 40, 60, 80, 100, 120...kV, são responsáveis pela diminuição do comprimento de onda do elétron e, conseqüentemente, pela resolução obtida. Por outro lado, o aumento na aceleração de voltagem aumenta a distância focal dos elétrons, isto é, estes vão focar em posições mais distantes da lente.

Acetato de Uranila – Ver **Contrastação**.

Ambiente Windows – Forma de apresentação de programas em computador, que no princípio utilizava ambiente conhecido como DOS, de interface pouco amigável, e que ainda é utilizada como linguagem única em alguns computadores associados aos microscópios.

Analizador – Filme colocado acima do plano das objetivas, e após o segundo prisma de Wollaston, que tem o eixo de polarização cruzado em relação ao primeiro filtro ou polarizador. O compensador tem como função recombinar as frentes de onda que

vibravam em ângulos de 90° , produzindo o contraste na microscopia interferencial.

Analógico – Sinal eletromagnético, gerado após a conversão da imagem do microscópio em uma câmera de vídeo.

Anel de fase – Anéis colocados na peça do condensador na posição correspondente ao diafragma, e outro na objetiva próximo ao plano focal posterior, que funcionam alterando a luz desviada pelo objeto em $\frac{1}{4}$ de comprimento de onda e reduzem a amplitude da luz não desviada pelo espécime.

Anticontaminadores – São instrumentos colocados próximos às aberturas e da própria lente objetiva, e são superfícies metálicas resfriadas em nitrogênio líquido a partir de um reservatório externo à coluna. Essas peças têm como função “atrair” ou condensar os contaminantes introduzidos junto com o espécime, minimizando assim o aparecimento de astigmatismo no sistema.

Anticorpo – Proteína da família das gamaglobulinas, formada como resposta a um estímulo imunogênico e capaz de interagir com o estímulo que levou a sua síntese ou com um outro estreitamente relacionado a ele. Pode ser separado em anticorpo primário e

secundário. Este último é normalmente associado a uma partícula fluorescente ou eletrondensa.

Antígeno – Substâncias que, após penetrarem no organismo, produzem reação imune e produção de anticorpos. Veja também **Anticorpos**.

ASA – Indica a sensibilidade do filme e sua adequação para cada situação. Por exemplo, filmes de ASA 100 devem ser utilizados para microscopia de campo claro e técnicas de contraste; filmes de ASA 400 para microscopias de fluorescência ou com baixa intensidade.

Astigmatismo – Aberração associada à microscopia eletrônica e causada pela não uniformidade do campo eletromagnético nas lentes. O astigmatismo pode ser causado por imperfeições na fabricação das lentes, mas usualmente é consequência da introdução de sujeira no sistema.

Aumento – Em microscopia podemos separar em dois tipos: o aumento lateral, que é a razão entre a distância entre dois pontos na imagem para a distância dos mesmos dois pontos no objeto; e o aumento axial, aquele medido em paralelo ao eixo óptico do microscópio, também limitado pela profundidade de campo dada pela objetiva. Este aumento é obtido do quadrado do aumento lateral.

Aumento útil – Quando o aumento é acompanhado de ganho de resolução, dizemos que tivemos aumento útil; caso o aumento não esteja acompanhado de resolução, temos a situação conhecida como aumento vazio.

Aumento vazio – Quando o aumento não é acompanhado de ganho de resolução.

Auto-radiografia – Metodologia que utiliza radioisótopos para acompanhar ou localizar processos celulares ou substâncias dentro das células. As substâncias radioativas são administradas no animal vivo, que depois é sacrificado. A amostra contendo o tecido em questão é processada e posteriormente uma secção do tecido é colocada junto a uma emulsão fotográfica. O conjunto é, após certo tempo, observado em microscopia de luz ou eletrônica.

Birrefringência – É a presença de diferentes índices de refração para ondas de luz que vibram em diferentes planos em um mesmo meio. Isto é, estruturas birrefringentes, quando atravessadas por luz, produzem um raio refratado com dois planos de vibração perpendiculares entre si.

BMP – Formato de imagem (veja também **Formatos de Armazenagem de Imagens**).

BNC – Cabo de conexão que substitui o RCA, utilizado principalmente em equipamentos profissionais ou de origem européia (veja também **Sinal composto e Sistema de cores**).

Bomba difusora – Responsável pelo alto vácuo da coluna do microscópio, vácuo este que deve ficar entre 10^{-5} a 10^{-7} Pa para o bom funcionamento do aparelho. Estas bombas, ao contrário das bombas rotatórias, não apresentam partes móveis, exercendo sua função, como o nome indica, por difusão. Esta bomba só consegue operar após a bomba rotatória ter estabelecido um vácuo inicial.

Bomba rotatória – Utilizada para estabelecer um vácuo inicial para que a bomba difusora possa alcançar o alto vácuo. Com esta bomba se obtém vácuo em torno de 10^0 a 10^{-1} Pa. Como o próprio nome indica, utiliza-se de um rotor que gira rapidamente, retirando através de uma mangueira o ar da coluna do microscópio.

Câmeras de vídeo digitais – São modelos modernos, onde o sinal capturado no *chip* fotossensível é digitalizado e enviado diretamente a um computador, não havendo produção de sinal analógico. As imagens também podem ser armazenadas em fitas especiais, mas normalmente em modo

comprimido (veja também **Analogico e Digital**).

Canhão de elétrons – Também conhecido como *electron gun*, é a peça responsável por extrair e direcionar os elétrons. É composto pelo filamento, o catodo, localizado dentro de um cilindro, conhecido como cilindro de Wehlnet. Este último cria uma atmosfera negativa, de tal forma que repele os elétrons produzidos pelo filamento em toda a sua área, exceto por uma pequena abertura de 2-3mm, posicionada diretamente à frente do filamento. A terceira parte do canhão de elétrons é composta pelo anodo, que fica aterrado e posicionado diretamente à frente do cilindro de Wehlnet. Os elétrons retirados do filamento são atraídos para o anodo e, conseqüentemente, para a coluna do microscópio.

CCD – Do inglês *Charged-Coupled Device*, é um *chip* fotossensível colocado no lugar dos tubos de imagem nas câmeras de vídeo mais modernas.

Cilindro de Wehlnet – No sistema de iluminação do ME, é a peça metálica que recebe o filamento e cria um campo negativo repulsor de elétrons. Os elétrons produzidos pelo filamento são então impulsionados através de uma única e pequena abertura do cilindro, a

qual está direcionada para o anodo (veja **Canhão de elétrons**).

Circuito fechado de TV – CCTV – Sistema desenvolvido por razões de segurança, onde uma câmera de vídeo envia diretamente, através de cabos coaxiais, o sinal para o monitor ou gravador. Sistema normalmente encontrado em bancos e no comércio em geral.

Citoquímica enzimática – Nesta metodologia se utilizam as funções ou características das enzimas para identificar seus sítios de ação nas células ou organelas. O produto ou um dos produtos das reações enzimáticas é uma substância que precipita e gera uma cor identificada na microscopia de luz ou uma substância eletrondensa que pode ser visualizada na microscopia eletrônica.

Citrato de chumbo – Ver **Contrastação**.

Coletor e Iluminador – No sistema de iluminação do microscópio de luz, geralmente se utiliza uma lâmpada de halogênio, que produz luz que é coletada por um sistema de lentes localizadas na base do microscópio e carreadas para o condensador.

Coloração – Em microscopia de luz, utilizam-se corantes como a hematoxilina e eosina, ou

tricroômico de Gomori, e outros, para criar contraste em tecidos fixados.

Compactação – Compressão de arquivos ou imagens. No caso desta última, associada à perda de informação e principalmente de precisão morfolométrica. Os arquivos mais utilizados para a compactação de imagens são TIFF comprimido e JPEG.

Compensador – Peça onde se modula o retardo dos componentes da luz polarizada, no microscópio de polarização. O retardo dos componentes e depois sua interferência resultam nas cores de interferência, característica das velocidades de propagação dos raios de luz na amostra.

Comprimento de onda – É a distância entre dois pontos numa onda, onde a diferença de fase é igual a 2π radianos.

Condensador – É o conjunto de lentes que têm a responsabilidade de condensar a luz sobre o espécime. Existem condensadores mais caros, com correções para as aberrações cromáticas e esféricas, possibilitando números de abertura de até 1.4. As lentes condensadoras são aquelas que devem ser ajustadas para focar o diafragma de campo junto com a imagem na iluminação de Köhler.

Contrastação – Em microscopia eletrônica utilizam-se metais pesados, os quais vão impregnar seletivamente os tecidos e estruturas celulares. Os elétrons do feixe, quando atravessam a amostra, são refletidos ou refratados pelos metais, não incidindo na tela fosforescente, criando contraste. As soluções usualmente utilizadas na contrastação são o acetato de uranila e o citrato de chumbo.

Contrastação negativa – Técnica utilizada em microscopia eletrônica para observar espécimes sem haver necessidade de cortá-los em ultramicrótomos. Para este fim, deposita-se numa grade recoberta por um filme plástico (usualmente se utiliza uma substância conhecida como *formvar*) uma gota com o material, fixado ou não, deixando-o secar. Em seguida incuba-se o material com substância contendo metais pesados para a geração do contraste e observa-se ao microscópio. Ao contrário da observação convencional, onde se impregna o material com metais pesados para que este apareça escuro num fundo claro, na contrastação negativa o fundo fica carregado pelo contrastante e o material aparece mais claro. Evidentemente, se o espécime for muito espesso, pouco ou nenhum detalhe será observado.

Contraste – É o grau de distinção que um objeto apresenta em relação ao fundo, ou a capacidade de se diferenciar do fundo. O material biológico normalmente apresenta pouco contraste quando observado ao microscópio. Em microscopia de luz, podemos utilizar corantes, normalmente com material fixado ou técnicas para amplificar o pequeno contraste já existente na amostra. Em microscopia eletrônica, não se usam corantes, já que os elétrons não podem ser percebidos pelo olho humano e por isso não apresentam cores. A tonalidade de cinza do material, ao ser visualizado no ME, deve-se a sua impregnação com metais pesados, os quais vão desviar ou interagir com o feixe, criando contraste (ver também **Coloração e Contrastação**).

Contraste de fase – Técnica desenvolvida por F. Zernike, para amplificar as diferenças de fase de um objeto de baixo contraste, por isso pouco visível, produzindo uma imagem do objeto com muito contraste.

Corrente do escuro – Conhecida como *dark noise*, é um ruído ocasionado pela flutuação térmica nos *chips* das câmeras CCD, mesmo quando estas estão no escuro total, causando degradação na qualidade da imagem.

Cortes ópticos – São fatias ópticas, não físicas, do material observado e que correspondem à profundidade de campo de uma determinada objetiva. Desta forma, objetivas de NA maior produzirão cortes ópticos mais finos. A melhor situação para obter fatias ópticas finas se encontra na microscopia confocal. Nesta microscopia utilizam-se aberturas, onde a luz dos planos acima e abaixo daquele corte óptico determinado é subtraída da imagem final (ver também **Microscopia confocal a laser e Aberturas na microscopia confocal**).

Curvatura de campo – Em função da forma convexa das lentes, os raios que atravessam as regiões periféricas vão focar de forma distinta dos raios que atravessam as porções centrais. Em lentes não corrigidas, a imagem nunca está totalmente em foco.

Detetores em MEV – Diversos modelos de detetores existem hoje em dia no mercado. Basicamente, os MEV apresentam detetores para elétrons secundários e detetores para elétrons *backscattered*. Com a nova tecnologia de microscopia de varredura com vácuo variável, foram introduzidos no mercado novos detetores para elétrons secundários, e *backscattered* para o modo

baixo vácuo e para o modo conhecido como ambiental.

Diafragma de campo – Abertura regulável localizada na base do microscópio, na saída das lentes do sistema coletor-iluminador. Utilizada para se posicionar corretamente o condensador na iluminação de Köhler. Esta abertura fica em plano conjugado com o espécime, quando a iluminação é feita corretamente.

Diafragma do condensador – Abertura regulável localizada entre as lentes condensadoras, muito útil para ajustar a forma do cone de iluminação, de tal maneira que, quando fechado, este diafragma aumenta o contraste, diminuindo a resolução da imagem. O contrário ocorre quando este diafragma é aberto.

DIC – *Differential Interference Contrast* – Veja **Microscopia de contraste interferencial de Normaski**.

Digital – Termo utilizado para designar informação convertida em números, geralmente após sua passagem por um digitalizador.

Disco de Airy – Disco brilhante de luz, formado por um centro claro seguido por anéis concêntricos claros e escuros. O disco de Airy é formado pela passagem de um ponto de luz do objeto pelas lentes do microscópio. O disco

representa o padrão de difração de um ponto do objeto, após este passar pelas lentes perfeitas do microscópio. O raio do disco de Airy determina a resolução do sistema.

Disquetes 5 1/4" – São meios de armazenagens digitais “antigos” (utilizados até o início da década de 90), para *drives* não mais encontrados no mercado de computadores. Atualmente se utilizam disquetes 3 1/2" (veja também **Meios de armazenagem de dados**).

Distância de trabalho – É a distância que a lente objetiva fica do material. Esta distância de trabalho é particularmente importante na microscopia de varredura, onde a lente objetiva na verdade é a C3, terceira lente condensadora. A distância de trabalho no MEV influencia a resolução, a profundidade de campo e por fim a intensidade do sinal. Menores distâncias de trabalho aumentam a resolução e o sinal, e diminuem a profundidade de campo, o inverso acontecendo com distâncias maiores.

Distância focal – É a distância a que o objeto deverá estar para que a lente gere a imagem em foco. No caso do olho humano, o poder de acomodação do cristalino nos permite focar objetos em distâncias variadas até o limite máxi-

mo de aproximação, que está em torno de 25cm.

Dynamic range – Em vídeo ou numa emulsão fotográfica, é a razão de máximo e mínimo de nível de sinal que o sistema é capaz de captar sem a introdução de defeitos e distorções na imagem.

EDX - Energy Dispersive X-Ray Detectors – Detetor de raios X utilizado com frequência nos estudos biológicos. O detetor é formado por um semiconductor em forma de disco e manufaturado a partir de um cristal de silício. Quando um raio-X atinge o detetor, ocorre uma alteração na capacidade do cristal de conduzir carga, sendo a energia do raio-X proporcional à condutividade do cristal. Além do EDX, existe o **WDX (Wavelength Dispersive X-Ray Detector)**: neste tipo de detetor, apenas uma pequena fração dos raios X que sai do espécime atinge o cristal e é detectada. O cristal neste detetor somente vai refletir uma pequena faixa de comprimento de onda dos raios X, sendo então muito específico para um determinada faixa atômica.

EELS – Veja Espectroscopia de perda de energia.

Elétrons *backscattered* – São elétrons gerados após a interação do feixe eletrônico com a amostra, porém

sem perder velocidade ou energia. Conhecidos como elétrons de espalhamento elástico, não produzem imagens biológicas reconhecíveis da amostra, porém geram uma mapa atômico do material.

Elétrons de espalhamento elástico

– São elétrons que, quando em contato com a amostra, mudam de direção, porém sem perda de energia. Quando estes elétrons, depois de se chocarem com a amostra, voltam na direção em que vieram, são chamados *backscattered*. Veja também **Elétrons *backscattered***.

Elétrons de espalhamento inelástico

– São elétrons que, quando atravessam o espécime, perdem certa quantidade de energia. Os elétrons transmitidos pela amostra podem ser utilizados para a produção de imagens ou separados em vários níveis de energia por um espectrômetro, para a determinação da composição dos elementos.

Elétrons secundários

– São elétrons de baixa energia produzidos pelas camadas superficiais da amostra após a irradiação pelo feixe incidente. Também conhecidos como elétrons inelásticos, são normalmente utilizados para a produção da imagem biológica em microscopia de varredura.

Epon – Veja em **Resinas**.

Epi-iluminação – Forma de iluminação onde a fonte luminosa é projetada sobre o espécime, sem que se espere que a luz o atravesse. O sinal ou imagem obtido corresponde então àquele emitido ou refletido pela superfície do material observado. Modo usual de observação nas lupas, microscópios de fluorescência e microscópio confocal.

Espectroscopia – Também conhecida como espectroscopia de perda de energia, é uma técnica utilizada para detectar e diferenciar os níveis de energia dos elétrons que foram transmitidos através do espécime. Através dessa análise, pode-se verificar a composição e a quantidade dos elementos de uma amostra.

Espelho dicróico – É um tipo de espelho utilizado em microscopia de fluorescência e confocal que reflete luz abaixo de um determinado comprimento de onda (usualmente a luz de excitação), porém transmite a luz acima de um certo comprimento de onda (usualmente a luz de emissão).

Estativa – É a base onde está apoiado o microscópio de luz. O formato da base é fundamental para o bom equilíbrio do aparelho. Uma base firme faz com que o microscópio e a imagem fiquem

mais estáveis, daí o termo “estativa”.

Estereologia – É um grupo de métodos matemáticos onde, a partir de seções, procura-se obter parâmetros tridimensionais de uma amostra. Muitos pesquisadores chamam-na também de morfometria não-métrica.

Field emission gun – Fonte de emissão de elétrons não-termiônica, onde se produzem feixes com *spots* extremamente pequenos (menos de 0.2mm) e extremamente energéticos, ideais para a produção de imagens em alta resolução, mas que necessitam de alto vácuo.

Filamentos – Os microscópios utilizam como fonte de iluminação filamentos que normalmente são de halogênio, em microscopia de luz, e de tungstênio, em microscopia eletrônica.

Fixadores – São substâncias químicas ou meios físicos utilizados para preservar o material biológico por longo prazo. Em microscopia pode-se utilizar fixação física por técnicas de congelamento ou fixações químicas através de diversas substâncias como o formaldeído e o paraformaldeído, utilizados freqüentemente em microscopia de luz ou como o glutaraldeído, utilizado na microscopia eletrônica.

Formatos de armazenagem de imagens – Existem diversos

formatos para a armazenagem de imagens. Os formatos mais conhecidos e utilizados são o TIFF e o BMP. A maior parte dos formatos pode ser intercambiável; para isso existem diversos programas *freeware* e *shareware*.

Formaldeído – Veja em **Fixadores**.

Fotômetro – Dispositivo associado às câmeras fotográficas que mede a intensidade da luz e ajusta ou indica a velocidade com que o *shutter* da câmera deve ser aberto para que se obtenha uma boa exposição para aquele determinado tipo de filme (ver também **ASA** e **Sistemas de armazenamento de dados**).

Fotomicrografia – É a associação de câmeras fotográficas analógicas ou digitais com microscópios.

Fluorocromos – Substância que, após absorver uma certa quantidade de energia na forma luminosa, emite um outro tanto de luz com comprimento de onda mais longo que aquele absorvido e consequentemente com menor nível energético.

Frame grabber – Placa digitalizadora, conversora do sinal analógico vindo, por exemplo, de uma câmera de vídeo, para o formato digital em um computador. Esta peça é fundamental para o processamento de imagens, pois deve ser compatível com o sistema de

cores usado, limitando a resolução da imagem digital e a velocidade de digitalização do sinal.

Frequências espaciais – São padrões repetitivos num determinado espaço. Por exemplo, 10 pares de linhas/mm. Quanto maior o número de detalhes ou linhas por espaço, maior é dita a frequência espacial e, em termos práticos, a resolução.

Funções de aquisição – Num programa de processamento de imagens, responsáveis por direcionar e selecionar a forma de aquisição da imagem.

Funções de avaliação – Num programa de processamento de imagens, são as funções que vão transformar os dados obtidos em apresentações gráficas, tabelas etc.

Funções gráficas – Num programa de processamento de imagens, são as funções responsáveis pelos trabalhos no plano gráfico e produção dos *overlays* (veja **Overlay**).

Funções de imagem – Num programa de processamento de imagens, são responsáveis pelo direcionamento no disco rígido do computador onde a imagem deve ser salva e/ou recuperada posteriormente.

Funções de organização de dados – Num programa de processamento de imagens, são as funções que nos permitem organizar os

dados em listas para posterior envio, armazenagem etc.

Funções de medida – Num programa de processamento de imagens, são aquelas funções onde especificaremos que medidas deverão ser realizadas pelo sistema.

Funções morfológicas – Num programa de processamento de imagens, são responsáveis pelas alterações morfológicas nos objetos da imagem, tentando individualizá-los para posterior análise.

Funções de qualidade – Num programa de processamento de imagens, são as funções responsáveis pela melhoria visual das imagens em contraste, brilho, foco etc.

Funções de segmentação – Num programa de processamento de imagens, são aquelas rotinas para identificar ou individualizar os objetos para que estes possam ser medidos pelo programa. Nesta função podemos optar pela segmentação manual, semi-automática ou automática.

Funções de transformação – Num programa de processamento de imagens, são responsáveis por alterações geométricas na imagem, como rotação, inclinação etc.

Gemini – Novo desenho de lentes para a microscopia de varredura, com componentes magnéticos e eletrostáticos que minimizam o

efeito das aberrações, produzindo imagens com maior resolução.

Glutaraldeído – Veja em **Fixadores**.

Goniômetro – É o sistema de manipulação do objeto ou espécime. Comporta o porta-objeto e pode funcionar manual ou automaticamente (veja também **Porta-objeto**).

Grades em MET – Suporte utilizado para apoiar os cortes na microscopia eletrônica de transmissão. Também conhecida como grelha, em função de ser formada por diversos quadrados perfurados, como uma grelha de churrasco, só que com 3 mm de diâmetro.

Hardware – É a parte física do computador, suas peças, teclados, monitor.

Histograma – É um gráfico que apresenta a distribuição do número de *pixels* contra a faixa de tons de cinza de uma imagem.

Iluminação crítica – Também conhecida como iluminação de Nelson. A fonte luminosa é focada ou concentrada sobre a amostra. Ao contrário da iluminação de Köhler, na iluminação crítica o campo é iluminado de forma intensa, porém desigualmente.

Iluminação de Köhler – Modo de iluminação onde se ajusta a altura do condensador de forma que a fonte luminosa fica em plano conjugado com o diafragma do

condensador, e o diafragma de campo fica em plano conjugado com o espécime e com a retina do observador. Neste modo de iluminação, o campo é iluminado de forma uniforme e coerente.

Iluminação de Nelson – Veja **Iluminação crítica**.

Imagem Intermediária – Imagem gerada pelas objetivas e que são utilizadas pelas oculares para gerar uma imagem virtual que será visualizada pelo observador. (Veja também *Infinity correction objectives* e *Tube lens*).

Imunocitoquímica – Processo que detecta antígenos a partir de anticorpos direcionados contra eles. As partículas de anticorpo podem estar associadas a fluorocromos e ser visualizadas por microscopia de fluorescência ou estar conjugadas com partículas de ouro e ser visualizadas por microscopia eletrônica.

Infinity correction objectives – ou **ICS** – *Infinity correction system* – Tipo de lente objetiva onde os raios produzidos são “focados” para o infinito (veja *Tube lens*).

Intensificador – Aparelho normalmente fixado ou rosqueado à frente do alvo fotossensível da câmera de vídeo, funcionando como um fotomultiplicador, amplificando o sinal que vai alcançar a câmera.

Interferência da luz – Quando raios luminosos que apresentam características distintas – como amplitude, fase ou plano de vibração – são colocados juntos e interferem uns com os outros, a interferência é dita construtiva se o objeto aparece mais brilhante que o fundo; é chamada de destrutiva se o objeto aparece mais escuro do que o fundo.

ISIT – *Intensifier silicon intensifier target tube* – Câmera de vídeo de tubo desenhada para utilização em situações de baixíssima intensidade luminosa.

Lâmpada de vapor de mercúrio – **HBO** – Lâmpada normalmente associada à microscopia de fluorescência, com voltagens que variam de 50 a 200 watts. Estas lâmpadas fornecem luz na faixa próxima do UV, com comprimentos de onda entre 313 a 578 nm (veja também **Microscopia de fluorescência**).

Lasers – Acronismo do inglês *light amplification by stimulated emission of radiation*, é formado por um dispositivo contendo material (cristal, vidros, gases...) excitável por luz ou descarga elétrica, produzindo luz em um comprimento de onda muito preciso, o qual varia com o elemento utilizado.

Lentes eletromagnéticas – São bobinas que, quando atravessadas

por correntes elétricas, criam um campo eletromagnético e vão convergir ou focar o feixe de elétrons em um determinado ponto focal, funcionando de forma similar a lentes de vidro.

Lentes acromáticas – São lentes corrigidas para aberrações cromáticas em dois comprimentos de onda, geralmente para o vermelho e o azul.

Lentes apocromáticas – São lentes corrigidas para aberrações cromáticas em três comprimentos de onda, e livre de aberrações esféricas para dois comprimentos de onda.

Lentes condensadoras - ME – Normalmente formadas por um par de lentes eletromagnéticas C1 e C2 que têm como função focar os elétrons sobre o espécime, controlando a quantidade de radiação ou iluminação que alcança o material.

Lente intermediária - ME – Auxilia a lente objetiva na produção do aumento. Em baixos aumentos, a lente objetiva é desligada e, nesses casos, a lente intermediária passa a ser responsável pela produção da imagem primária.

Lente intermediária - M. luz – (veja *Tube lens*).

Lente objetiva - ME – Como em microscopia de luz, são as mais importantes lentes na microscopia

eletrônica, pois são aquelas que formam a imagem que posteriormente será amplificada pelas outras lentes.

Lentes plan-apocromáticas – São lentes corrigidas para aberrações cromáticas em três comprimentos de onda, e livre de aberrações esféricas para dois comprimentos de onda, além de corrigidas para curvatura de campo.

Lente projetora - ME – Alguns microscópios têm duas lentes projetoras que auxiliam na geração do aumento e são responsáveis pela projeção da imagem na tela fosforescente.

Lentes semi-apocromáticas – Também conhecidas como fluoritas, são consideravelmente melhor corrigidas que as lentes acromáticas, porém não tão boas quanto as lentes apocromáticas. São corrigidas para aberrações esféricas em três comprimentos de onda, sendo bem mais baratas que as lentes apocromáticas.

Luz de ordem 0,1,2... – Ou ordens de luz. Um espécime periódico difrata o feixe de luz que o atravessa em vários ângulos. A luz não desviada pelo objeto é chamada de ordem zero, e, quanto maior o desvio, maior a ordem: 1ª ordem, 2ª ordem... Cada ordem de luz é focada no plano focal posterior da objetiva. O pe-

ríodo ou espaço entre as ordens é proporcional à abertura numérica da objetiva.

Luz parasita – Luz excedente que não contribui para a formação da imagem. Pode ser originada a partir do próprio microscópio ou por fontes de luz externas.

Luz plano-polarizada – Luz originada de um filtro polarizador, que vibra em um só plano, que é determinado pelo arranjo dos cristais no filtro.

Meios de armazenamento de dados – As imagens e informações obtidas pelos diversos microscópios e aparelhos associados podem ser armazenadas em filmes fotográficos de sensibilidade variada (ASA), em fitas de vídeo VHS ou SVHS, em arquivos digitais em disquetes, *Zip-Disks* ou em CDs, entre outros (veja também **Disquetes 5^{1/4}**).

Meios de trabalho das objetivas (ar, óleo, água) – As objetivas podem trabalhar imersas ou não em meios líquidos, isto vai depender do NA de cada uma. Objetivas com abertura numérica menor do que 1 trabalham geralmente em ar; já objetivas com aberturas maiores que 1 (1.2, 1.4) devem receber uma camada de óleo de imersão entre a lente e a lamínula. Isto se deve ao fato de o índice de refração do vidro e o do

óleo serem próximos, fazendo com que não haja grandes perdas na passagem dos raios de um meio para o outro — isto é, para que aqueles raios refratados pelo espécime em grandes ângulos não sofressem desvio maior quando atravessassem a lamínula. Existem ainda objetivas desenhadas para trabalhar diretamente em contato com a água. Como muitas vezes o meio de montagem da lâmina foi aquoso (não em bálsamo do Canadá), o espalhamento de raios será bem modificado antes mesmo que estes atinjam a lamínula. As objetivas projetadas para este trabalho podem alcançar aberturas de 1.2, mas são extremamente caras.

Metalizador – Aparelho utilizado para recobrir o espécime com uma camada de metal condutor como ouro, platina etc. A metalização pode ser feita por *sputtering*, aparelho onde o alvo metálico é atingido por Ar⁺ (argônio) ionizado, causando a ejeção de átomos do metal que vão recobrir o espécime, ou por evaporação térmica, onde, em um recipiente com vácuo, um metal é aquecido e se depositam os metais sobre a amostra.

Mesa ou platina – Superfície sobre a qual é colocada a lâmina contendo o espécime. A platina ainda apresenta movimentos em X, Y, além de, através dos botões de macrométrico e micrométrico, se

ajustar o foco sobre o espécime. A platina pode ser ainda motorizada, sendo então controlada por computadores associados ao microscópio.

Microanálise – Também conhecida como microanálise de raio X, esta técnica classifica os raios X gerados pela interação do feixe com a amostra, com finalidade de se obter aspectos ou características analíticas do material.

Microcinematografia – Técnica que utiliza câmeras com rolo de filme associadas aos microscópios. A diferença entre esta metodologia e a vídeo-microscopia é que, na primeira, não há a possibilidade de se manipular a imagem antes de gravá-la. O resultado do trabalho, como ocorre no cinema, só poderá ser visualizado após a revelação do filme.

Microscopia confocal a laser – Tipo de microscopia onde um ponto de luz coerente, criado por um *laser* e focado através da objetiva, varre a amostra. A luz refletida ou gerada na amostra volta pela objetiva e atravessa uma abertura antes de atingir o detetor. Esta abertura bloqueia toda a luz gerada pela amostra, exceto aquela que partiu do exato plano de foco no espécime, e que está em “confocalidade” com as aberturas, também conhecidas como *pin-holes* (veja também *Lasers*).

Microscopia de campo claro –

Neste tipo de microscopia, nenhuma técnica ou artifício é utilizado para criar contraste. Geralmente os microscópios mais simples só utilizam este tipo de microscopia, e o material deve ser corado ou apresentar algum tipo de coloração para ser visualizado.

Microscopia de campo escuro –

Neste tipo de microscopia, toda a luz que não for desviada pelo objeto ou luz direta não é capturada pela objetiva. Somente a luz desviada pelo objeto penetra a objetiva. O material aparece claro ou brilhante num fundo escuro.

Microscopia de contraste de fase –

Tipo de microscopia largamente utilizado para se criar contraste em objetos pouco defasantes (com pequenas diferenças no caminho óptico ou índice de refração, mas não suficientes para criar contraste), onde se utilizam anéis de fase colocados no condensador e na objetiva para amplificar o contraste dos objetos e os fazer visíveis sem a necessidade de corantes.

Microscopia de contraste de Varel

– Tipo de microscopia que mistura contraste de fase e iluminação oblíqua através do posicionamento junto aos anéis de fase convencionais, de uma nova peça que ilumina unilateralmente o espécime e interfere com a iluminação de fase, dando à imagem um aspecto de relevo.

Microscopia de fluorescência –

Tipo de microscopia onde se utiliza uma fonte luminosa que atinge o espécime por epi-iluminação e excita um fluorocromo que está associado à molécula ou estrutura em estudo. Como resultado da excitação, o fluorocromo emite uma luminescência que será captada pelo microscópio e produzirá um ponto luminoso em um fundo escuro.

Microscopia de luz – Neste tipo de microscopia, também conhecida como microscopia óptica, utilizam-se várias lentes para gerar resolução e aumento, a partir da iluminação do espécime com fótons.

Microscopia de iluminação oblíqua – Neste tipo de microscopia, um disco opaco é colocado bloqueando parcialmente a passagem da luz no condensador. Como resultado desta técnica, apenas um lado do espécime é iluminado, fazendo com que os efeitos de sombra criem um aspecto tridimensional na imagem.

Microscopia de polarização – Técnica utilizada para revelar ou realçar a birrefringência do material, a qual está ligada à presença de padrões cristalinos no espécime, como estriações regulares, comumente observadas em algumas fibras. Utiliza-se de filmes

polaroids cruzados, que fazem com que a luz vibre em um plano e, após interagir com o material, tenha seus planos de vibração alterados. Uma peça conhecida como compensador revela as alterações na polarização, conferindo-lhes cores (veja também **Compensador**).

Microscopia de contraste interferencial de Normaski (DIC) –

Considerada a técnica de criação de contraste mais eficiente, também conhecida como DIC (*Differential interference contrast*). Este tipo de contraste cria um padrão de sombras na imagem e lhe confere um aspecto tridimensional. As diferenças de contraste refletem um gradiente de diferentes “caminhos” ópticos que, após atravessarem o espécime, interferem uns com os outros, gerando a imagem.

Microscopia digital – Associação entre computador e microscópio, onde o primeiro passa a ser responsável pelo gerenciamento do funcionamento do segundo, permitindo o controle a distância desses aparelhos.

Microscopia eletrônica – Neste tipo de microscopia, utilizam-se elétrons no lugar de fótons e lentes eletromagnéticas no lugar de lentes de vidro. O resultado é uma resolução muito maior e consequentemente maior aumento.

Microscopia eletrônica de transmissão – Neste modo de microscopia, o feixe de elétrons atravessa o espécime, indo excitar a tela fosforescente, a qual apresentará a imagem.

Microscopia eletrônica de varredura – Neste modo de microscopia, a imagem apresentada no monitor é o resultado da interação do feixe de elétrons com a amostra, e produzida por elétrons refletidos por esta.

Microscopia eletrônica de varredura de vácuo variável – Este microscópio de varredura é dotado de um sistema de bombas de vácuo que criam atmosferas diferenciadas de vácuo na coluna. A região próxima ao objeto fica numa situação de vácuo baixo; já as regiões próximas ao filamento ficam em situações de vácuo mais alto. Esta montagem permite que se observem espécimes diretamente, sem haver a necessidade de secá-los pelo método do ponto crítico.

Micrótomo – Aparelho utilizado para seccionar em fatias de alguns micrômetros de espessura o material para a visualização por microscopia de luz.

Modelo tridimensional – Modelo ou representação obtido a partir da montagem de seções físicas ou ópticas de um material.

Metodologia utilizada em microscopia confocal para a montagem dos cortes ópticos obtidos por varreduras sucessivas no plano Z.

Morfometria – Análise das características geométricas associadas aos objetos, como área, distância, perímetro etc. Pode ser realizada manualmente, a partir de fotos e negativos, ou automaticamente, com o auxílio do computador. Os resultados da morfometria podem ser obtidos no sistema métrico, isto é, em milímetros, micrômetros, ou através de relações volumétricas, a estereologia (veja **Estereologia**).

NTSC – Veja **Sistema de cores**.

Objetiva – Lente mais importante em um microscópio. É a lente ou o conjunto de lentes que realmente vai resolver e amplificar o objeto. Existem vários tipos de lentes objetivas, com graus diferenciados de correção para as aberrações cromáticas, esféricas e curvatura de campo. Existem ainda objetivas especiais para os tipos de contraste, além daquela utilizada em campo claro. Normalmente, para alcançar o grau de perfeição necessário em microscopia, as lentes objetivas são formadas por diversas lentes unidas, e atualmente são projetadas por computador (veja também **Meios de trabalho das objetivas**).

Objetos defasantes – Em microscopia, são objetos que, quando atravessados pela luz, atrasam-na em $\frac{1}{4}$ de comprimento de onda, não produzindo, no entanto, contraste.

Oculares – Apesar de não terem a importância das lentes objetivas, as lentes oculares são as responsáveis pela amplificação final e a apresentação da imagem à retina. Em algumas oculares podemos encontrar dispositivos para o ajuste da acuidade visual de diversos observadores, além de grades de calibração.

Overlay – Representação gráfica posicionada acima da imagem num plano próprio, podendo ou não ser adicionada à imagem final.

Pa – Pascals – Unidade de pressão que equivale a 1.32×10^{-3} ATM (1 Pa), ou a 7.52×10^{-3} Torr. Por exemplo: levando-se em consideração a pressão atmosférica no nível do mar (1 ATM), e através da relação acima, podemos concluir que o microscópio eletrônico para operar bem deve alcançar uma situação de vácuo de no mínimo 10^{-5} Pa ou 1.32×10^{-8} ATM.

Pal-G – Veja **Sistema de cores**.

Pal-M – Veja **Sistema de cores**.

Parafina – Veja em **Resinas**.

Paraformaldeído – Veja em **Fixadores**.

Par estereoscópio – Os microscópios apresentam uma imagem biplanar que pode, através de uma relação de sombras, dar uma falsa impressão de tridimensionalidade. Mesmo em microscopia de varredura, para se obter imagens verdadeiramente tridimensionais é necessária a obtenção de duas imagens com pequenas variações de inclinação ou rotação, e montá-las em um visor estereoscópio ou em um computador.

Pixel – Picture element – Unidade formadora da malha do CCD, ou unidade formadora da imagem digital, guardando coordenadas e tonalidades de cinza ou cor da imagem original.

Plano focal posterior – Também conhecido como abertura posterior da objetiva, é o ponto de focalização dos raios de luz, após atravessarem as objetivas do microscópio. Esta posição não está em plano conjugado, na iluminação de Köhler, com o espécime, por isso não é visualizado junto a este na retina. O plano focal posterior da objetiva é local de formação dos padrões de difração da imagem, dos discos de Airy, estando em plano conjugado com o diafragma do condensador e com a fonte de iluminação, na iluminação de Köhler.

Planos conjugados – São planos ou pontos que focam juntos ou são

visualizados juntos. Na iluminação de Köhler existem dois grupos de planos conjugados: os planos conjugados com o filamento e aqueles conjugados com o espécime.

Point-scanning illumination –

Existe na microscopia confocal, onde se restringe a iluminação do espécime a um único ponto, através da colocação de aberturas que estarão em planos confocais, diferentemente da iluminação convencional, que iluminaria o campo como um todo. Alternativamente no modelo conhecido como *Slit scanning*, as aberturas são em fenda e a varredura passa a ser feita por uma linha de iluminação, o que torna o sistema mais rápido. Existe ainda um modelo conhecido como *Multiple-beam scanning*, o qual utiliza um disco perfurado que gira em alta velocidade, permitindo a varredura rápida de uma grande área do espécime (ver também **Microscopia confocal a laser**).

Polarizadores – Filtros feitos de determinados tipos de cristais, que têm como característica transformar a luz incidente e que vibra em todas as planos em uma luz plano-polarizada, vibrando em um só plano, determinado pela orientação dos cristais no filtro (veja **Microscopia de polariza-**

ção e Microscopia de contraste interferencial de Normaski).

Polaroids – São filtros que têm como característica ou propriedade polarizar a luz que o atravessa (veja **Polarizadores**).

Ponto-crítico – Técnica em que toda a água do material é retirada, após banhos sucessivos de etanol, e posteriormente substituída por freon ou dióxido de carbono em um aparelho, em alta pressão e sobre uma determinada temperatura. Nesta situação de determinada pressão e temperatura, o líquido alcança o ponto crítico, onde a densidade da fase líquida se iguala à da fase gasosa, isto é, há a alteração de fase (líquida/gasosa), sem haver grandes alterações energéticas e conseqüentemente alterações morfológicas.

Porta-objeto – Peça de aço ou de outros metais que tem como função posicionar corretamente, nas lentes objetivas, as grades onde estão apoiados os cortes do material na microscopia eletrônica de transmissão. O porta-objeto e o goniômetro permitem ao operador, de forma manual ou automática, manipular as grades em diversas direções laterais e também em rotação e inclinação.

Plano intermediário da imagem –

Na microscopia de luz, é o plano no qual as objetivas, diretamente

ou com o auxílio de lentes intermediárias (*Tube lens*), focam a imagem do espécime. Este plano geralmente está localizado a 10mm do encaixe das oculares. As oculares formam uma imagem virtual da imagem intermediária, a qual é visualizada pelo observador.

Prisma de Wollaston – Este prisma é formado por dois materiais birrefringentes colados, cujos eixos cristalográficos estão em ângulos retos. Na microscopia interferencial, existem dois prismas, um próximo ao condensador e outro na objetiva. O primeiro prisma tem a função de separar a luz incidente em duas frentes que vibram paralelamente e em ângulos de 90°; as frentes, que depois de passarem pelo espécime vão apresentar uma diferença de fase, são recombinadas no segundo prisma.

Profundidade de campo – É a distância entre um objeto mais próximo de um mais distante dentro de um foco e de uma situação de ajuste determinados. Isto é, dentro de um determinado foco, maior será a profundidade de campo quanto mais objetos poderão ser visualizados em foco em “alturas” distintas. A profundidade de campo depende e varia com o NA da objetiva, com o comprimento de onda da luz e com a profundidade de foco das lentes.

Profundidade de foco – É a faixa de distância entre a lente e o plano da imagem, onde a imagem estará em perfeito foco. O plano da imagem pode ser a retina do observador ou o alvo de uma câmera fotográfica ou de vídeo.

Raio X – Partícula energética gerada pela desaceleração de elétrons quando passam próximos ao núcleo (conhecidos como *Bremsstrahlung X-rays*) ou quando um feixe de elétrons com alta energia interage com os elétrons orbitais, ejetando um elétron das camadas mais internas. Para estabilização do átomo, um elétron de orbital mais externo pula para o orbital inferior e a energia excedente é liberada na forma de raio X.

RAM – *Random access memory* – Memória do computador que lhe permite trabalhar os dados de forma não permanente. Quanto mais memória RAM tem um computador, mais informação e mais rapidamente essa informação poderá ser processada.

RCA – Tipo de conexão utilizado para a transmissão de sinal de vídeo composto (veja **Sinal composto** e **Sistema de cores**).

Réguas ou grades de calibração – Desenho ou *layout* contendo um padrão de linhas que podem ser observadas nas oculares e utiliza-

das em conjunto com lâminas também graduadas para se determinar ou calibrar o aumento do microscópio de luz. As grades de calibração também são utilizadas na microscopia eletrônica com os mesmos fins. Neste caso o padrão de linhas é criado sobre um filme que está superposto à grade, ou por cristais de catalase, no caso de calibrações em grandes aumentos.

Reflexão – Modificação da direção de propagação de uma onda, que incide sobre a interface que separa dois meios diferentes e retorna para o meio inicial.

Refração – Modificação da forma ou da direção de uma onda, quando esta passa através da interface que separa dois meios e tem em cada um deles diferentes velocidades de propagação.

Relação sinal/ruído – Relação entre o sinal que traz informação para a formação da imagem e aquele que não contribui para a imagem, aparecendo no fundo como uma flutuação luminosa (pontos claros de distribuição randômica).

Remote control – Controle remoto ou a distância de aparelhos. No caso da microscopia, associado à presença de computadores no gerenciamento dos aparelhos (veja também **Microscopia digital**).

Resinas – São substâncias utilizadas para preencher os espaços antes ocupados por líquidos dos tecidos e estabilizá-los. Muitas resinas são utilizadas em microscopia eletrônica, como o **epon**, **araldite**, **spurr**, além da **parafina** e da **historesina**, utilizadas em microscopia de luz. Depois de estabilizados, os blocos poderão ser cortados em aparelhos adequados.

Resolução – É a capacidade de uma lente separar dois pontos próximos e apresentá-los como pontos separados na retina do observador ou no alvo da máquina fotográfica ou câmera de vídeo. Esta propriedade varia de lente para lente e de um tipo de microscópio para outro. O olho humano, em sua distância focal mínima, tem resolução máxima de 0.2 mm; o microscópio de luz, equipado de sua melhor objetiva e nas melhores condições de ajuste, tem limite teórico de resolução de 0.2 μ m; e o microscópio eletrônico de transmissão tem resolução teórica de 0.2nm.

Resolução de TV – É o número de faixas ou linhas pretas e brancas que podem ser apresentadas horizontalmente ou verticalmente no monitor ou carreadas num sistema de vídeo. Os equipamentos convencionais ou domésticos trabalham com resolução entre 250 e 400 linhas; já os sistemas pro-

fissionais trabalham com resolução acima de 800 linhas de TV.

RGB – *Red-green-blue* – Forma de sinal de vídeo ou tipo de câmera de vídeo em que não se utilizam os sistemas codificados de cores (NTSC, PAL-M ou PAL-G) e o sinal é carregado por três cabos separados, um para cada canal de cor. Desta forma, as cores apresentadas na imagem são muito mais fidedignas se comparadas àquelas obtidas nos sistemas de cores.

Shareware – São programas baixados pela Internet ou copiados que podem ser utilizados por tempo determinado sem pagamento. Uma taxa deve ser paga, caso sejam utilizados indefinidamente. Diferente do *freeware*, que é livre para uso por prazo indefinido.

Sinal composto – Também conhecido como *composite*, carrega toda a informação da imagem, bem como o sinal de sincronia num único cabo RCA (veja **Sistema de cores**).

Sistema de cores – O sinal transmitido ou carregado por cabos deve conter as informações de cor da imagem original, além dos códigos de sincronia. Sistemas codificados foram desenvolvidos por diversos países, como o NTSC (código americano e japonês), o PAL-G (europeu) e o PAL-M (brasileiro).

Sistema de vácuo – Sistema responsável pela manutenção do alto vácuo necessário ao funcionamento do microscópio eletrônico. Vácuo necessário para o livre trânsito dos elétrons até o espécime e deste para a tela de imagem.

Sistema de iluminação – ME – O sistema de iluminação em microscopia eletrônica é o responsável pela geração e emissão dos elétrons. É composto pelo canhão de elétrons e pelas lentes condensadoras.

Sistema de imagem em MET – Composto pelas lentes objetiva, intermediária e projetora, responsáveis pela produção da imagem, do aumento e da sua projeção na tela fosforescente.

Sistema de manipulação do espécime em MEV – O espécime normalmente é colocado numa peça de metal chamada de *stub* e posicionado dentro da coluna sobre uma mesa móvel. Através de controles manuais ou automáticos, pode-se movimentar esta mesa em X, Y e Z, além de rodá-la e incliná-la.

Sistema fotográfico em MEV – Sistema composto por um pequeno monitor de alta resolução ao qual uma câmera fotográfica é acoplada. Esta máquina fotográfica pode ser do tipo Polaroid ou utilizar filmes de 35mm ou chapas maiores.

Sistema fotográfico em M. luz –

Composto por máquina fotográfica e fotômetro, associados ao microscópio por um tubo trinocular (veja também **Fotômetro e Tubo trinocular**).

Sistema óptico em MEV –

Composto pelas peças do canhão de elétrons e pelas lentes condensadoras, que no MEV são três: C1, C2 e C3. Esta última é também conhecida como lente objetiva do varredura.

Sistema de processamento e apresentação de imagens em MEV

– No microscópio de varredura, o sinal transmitido pelo detetor é amplificado antes de ser apresentado ou visualizado. O MEV possui fotomultiplicadores e amplificadores para melhorar a relação sinal/ruído e o contraste da imagem. Os modelos mais modernos digitalizam o sinal que vem dos detetores e fotomultiplicadores para posteriormente apresentá-la no monitor.

Slow-scan cooled - CCD – São câmeras de vídeo digitais de alta resolução que resfriam o *chip*, evitando a corrente no escuro (veja também **Corrente do escuro**).

Software – São os diversos programas que habitam o computador e o fazem interagir com o usuário.

Spot – Modo de iluminação na microscopia eletrônica onde o

filamento é focado através de lentes condensadoras sobre o espécime. O tamanho do *spot* e seu formato são obtidos através da alteração da corrente nas lentes condensadoras, das aberturas e do uso de astigmatos, que auxiliam no processo através da correção do astigmatismo das lentes (veja também **Astigmatismo**).

SVHS – Sistema associado a alguns videocassetes, onde o sinal é carregado por um cabo Y/C, e o brilho e a croma do sinal NTSC são carregados separadamente e sem informação sonora. A resolução da imagem armazenada pode chegar ao dobro daquela carregada e armazenada em VHS convencionais.

Tampão – Solução tamponante –

Tampão é uma solução contendo ácidos e bases e seus respectivos sais, que dentro de uma faixa determinada são capazes de segurar variações iônicas, mantendo o pH da solução constante.

Tela fosforescente ou Ecran –

Alvo sobre o qual incidem os elétrons após atravessarem o espécime na microscopia eletrônica de transmissão. A tela fosforescente emite fótons, quando estimulada pelos elétrons que a alcançaram. Desta forma, elétrons que são invisíveis ao olho humano podem ser analisados indiretamente pela emissão de fótons.

Tempo real – Também conhecido como *real time*, é a velocidade de apresentação da imagem sem que ocorra *flicking*, isto é, de forma que seja percebido pelo observador de forma contínua, e não quadro após quadro. O tempo de apresentação crítica, isto é, aquele em que começamos a perceber os quadros, é de aproximadamente 15Hz (15 quadros por segundo), daí para baixo. A velocidade no modo NTSC é de 60 Hz/dupla varredura e, no modo PAL, 50Hz/dupla varredura.

Tetróxido de ósmio – Utilizado para criar contraste em microscopia eletrônica, pois se impregna nos fosfolipídios das membranas biológicas (veja também **Fixadores**).

TIFF - Formato de imagem (veja também **Formatos de armazenagem de imagens**).

Tube lens – Lentes posicionadas no tubo do microscópio, responsáveis pela convergência dos raios produzidos pelas objetivas ICS, para o plano intermediário de imagem (veja também *Infinity correction objectives* e **Plano intermediário de imagem**).

Tubo – Câmeras de tubo – Primeiros modelos de câmera de vídeo. Utilizam tubos com alvos fotossensíveis para aquisição das imagens a partir dos microscópios.

Tubo trinocular – Cabeçote do microscópio que apresenta, além das saídas binoculares, uma saída para câmera fotográfica ou de vídeo. Através de dispositivos próprios, o usuário pode optar pela observação através somente das oculares, por meio de oculares e câmera ou só através da câmera.

Torr – Unidade de pressão (veja **Pascais**).

TV – Resolução – Ver **Resolução de TV**.

Ultramicrotomo – Aparelho utilizado para seccionar em fatias de nanômetros de espessura o material para visualização em microscopia eletrônica de transmissão.

Videomicroscopia – É a associação entre os microscópios e as câmeras de vídeo, em microscopia de luz ou eletrônica.

WDX – Detetor de raios X (veja **EDX**).

Y/C – Cabo utilizado para carrear sinais SVHS, onde a croma e o brilho são enviados separadamente.



Sites na Internet sobre microscopia

■ **Nossos *sites***

<http://www2.uerj.br/~micron/> - Laboratório de Microscopia e Processamento de Imagens

<http://www2.uerj.br/~micron/labmel/index.html> - Laboratório de Microscopia Eletrônica

<http://www2.uerj.br/~micron/atlas/> - Atlas digital de microscopia

■ **Revistas digitais de microscopia**

<http://www.Microscopy-Online.com/>

<http://www.microscopy-uk.org.uk/>

<http://www.mwrn.com/>

■ **História da microscopia**

http://www.utmem.edu/personal/thjones/hist/hist_mic.htm

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/museum/index.html>

<http://www.americanartifacts.com/smma/microsco.htm>

<http://www.ucmp.berkeley.edu/history/hooke.html>

<http://www.ucmp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html>

<http://www.utmb.edu/mml/scopes/welcome.htm>

■ ***Sites* de microscopia de luz**

<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/microscopy.html>

<http://www.gen.latrobe.edu.au/microscopy/>

<http://www.videomicroscopy.com>

■ **Sites de microscopia eletrônica e microanálise**

<http://www.engin.umich.edu/micsites.html>

<http://www.umsl.edu/~fraundor/epc/index.html>

<http://www.lifelong.com/carnivalWorld/SEM/>

http://www.clinch.edu/cvc/r_baird/sem3.htm

<http://www.mos.org/sln/SEM/>

<http://ncem.lbl.gov/ncem.html>

■ **Sites de fotomicrografia**

<http://www.pbrc.hawaii.edu/~kunkel/>

<http://www.hitachi.co.jp/Div/keisokuki/english/nano/arte.html>

http://www.uq.edu.au/nanoworld/images_1.html

■ **Sites de microscopia confocal**

<http://www.cs.ubc.ca/spider/ladic/confocal.html>

<http://corn.eng.buffalo.edu/AMIL/index.htm>

<http://panda.uchc.edu/htbit/>

Microscopia

Abramowitz, Mortimer. *Contrast methods in Microscopy*. Olympus America Inc., 1987.

——— *Optics: a primer*. Olympus America Inc., 1984.

Bozzola, J. e Russel, L. *Electron Microscopy*. Jones and Bartlett Publishers, 1998.

Goldstein, J. et alii. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: a text for Biologists, Materials Scientists, and Geologists*. Plenum Press, 1992.

Kapitza, H. *Microscopy from the very beginning*. Carl Zeiss, 1994.

Rochow, T. e Tucker, P. *Introduction to microscopy by means of light, electron, X-rays or acoustics*. Plenum Press, 1994.

Videomicroscopia e processamento de imagens

Glasbey, A. e Horgan, G. *Image Analysis for the Biological Sciences*. John-Wiley and Sons, 1995.

Inoué, S. *Video Microscopy*. Plenum Press, 1997.

Marchevsky, A. e Bartels, P. *Image Analysis. A primer for pathologist*. Raven Press, 1994.

Russ, J. *Computer-Assisted Microscopy*. Plenum Press, 1990.

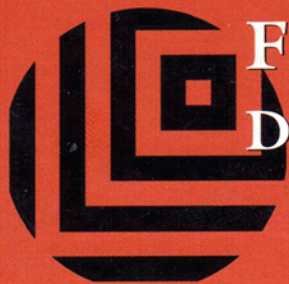
Shotton, D. *Electronic light microscopy*. Wiley-Liss, 1993.

Microscopia confocal e microscopia de fluorescência

Herman, B. *Fluorescence microscopy*. Royal Microscopical Society - Springer-Verlag, 1998.

Pawley, J. *Handbook of Biological Confocal Microscopy (The Language of Science)*. Plenum Press, 1995.

Sheppard, C. e Shotton, D. *Confocal laser scanning microscopy*. Royal Microscopical Society - Springer-Verlag, 1997.



FUNDAMENTOS DE MICROSCOPIA



ISBN 85-85881-94-1



9 788585 881948