

Dispositivo para Ampliação da Magnificação do Microscópio Óptico



ISSN 1678-0434

Novembro, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 32

Dispositivo para Ampliação da Magnificação do Microscópio Óptico

Antônio Pereira de Novaes
Paulo Sérgio de Paula Herrmann Jr
Rubens Bernardes Filho
Felipe Benette Marques

São Carlos, SP
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Sandra Protter Gouvea
Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Revisão de texto: Raíra Valente
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane
Capa foto: Antônio Pereira de Novaes
Editoração eletrônica: Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2010): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Instrumentação

-
- N935d Novaes, Antonio Pereira de
Dispositivo para ampliação da magnificação do microscópio óptico. /
Antônio Pereira de Novaes, Paulo Sérgio de Paula Herrmann Jr, Rubens
Bernardes Filho, Felipe Benette Marques. – São Carlos: Embrapa
Instrumentação, 2010.
16 p. – (Embrapa Instrumentação. Boletim de Pesquisa e
Desenvolvimento, ISSN 1678-0434; 32).
1. Microscopia óptica. 2. Fotomicrografia. I. Herrmann Júnior, Paulo
Sérgio de Paula. II. Bernardes Filho, Rubens. III. Marques, Felipe Benette.
IV. Título. V. Série

CDD 21 ED 502.82

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Resumen	8
1. Introdução	9
2. Materiais e métodos	10
3. Resultado	13
4. Conclusão	15
5. Referências	15

Dispositivo para Ampliação da Magnificação do Microscópio Óptico

Antônio Pereira de Novaes¹

Paulo Sérgio de Paula Herrmann Jr²

Rubens Bernardes Filho³

Felipe Benette Marques⁴

Resumo

Descreve-se a forma para o acoplamento de câmeras fotográfica ou cinematográfica digitais, à microscópio óptico. A câmera fixada na lente ocular do microscópio, possibilita obter-se fotomicrografia de imagens de materiais em lâmina apropriada, ou mesmo filme desse material (Figura 1).

Palavras chave: microscopia óptica, fotomicrografia

¹Médico Veterinário, MSc, novaes-consultor@cnpdia.embrapa.br

²Eng. Eletrotécnico, PhD, Pesquisador, Embrapa Instrumentação, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP. herrmann@cnpdia.embrapa.br

³Físico .PhD, Pesquisador, Embrapa Instrumentação, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP. rubens@cnpdia.embrapa.br

⁴Físico, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, Campus São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310, São Carlos, São Paulo, CEP 13565-905

Device to increase the magnification of the optical microscope

Antônio Pereira de Novaes
Paulo Sérgio de Paula Herrmann Jr
Rubens Bernardes Filho
Felipe Benette Marques

Abstract

In this paper we describe an instrument for coupling photographic or movie cameras to an optical microscope. This equipment allow us to obtain microscopic photos or movies of materials placed over a appropriate glass sheet.

Key words: optical microscope, photo micrography .

Dispositivo para aumentar la ampliación del microscopio óptico

Antônio Pereira de Novaes
Paulo Sérgio de Paula Herrmann Jr
Rubens Bernardes Filho
Felipe Benette Marques

Resumen

En el presente trabajo es descrito el dispositivo que permite acoplar las cámaras digitales fotográfica y cinematográfica a un microscopio óptico. Este dispositivo fija la cámara a la lente ocular del microscopio óptico haciendo posible la obtención de fotomicrografías de imágenes microscópicas de películas o de materiales adheridos a las mismas.

Palabras-clave: microscopia óptica, fotomicrofotografía

1. Introdução

A visualização de imagens em microscópio, é de extrema importância em diversas atividades profissionais. Não se sabe exatamente quem inventou o microscópio porém sabe-se que depois dessa invenção, no século XVII, nossa percepção do mundo invisível a olho nu ficou muito diferente. Atribui-se a invenção a Galileu, porém foi Leeuwenhoek quem realmente o aperfeiçoou e utilizou na observação de seres vivos. Os primeiros microscópios eram dotados de apenas uma lente de vidro, permitindo aumento de até 300 vezes com razoável nitidez, assim um mundo que se encontrava invisível aos nossos olhos, descortinou-se.

O microscópio simples de Leeuwenhoek, foi aprimorado por Hooke, ganhando mais uma lente, possibilitando aumentos ainda maiores (SYNGE, 1928). Os microscópios ópticos modernos são bem mais poderosos do que os usados pelos cientistas no início do século XVII, são dotados de dois sistemas de lentes de cristal (oculares e objetiva) que produzem ampliações de imagem que vão de 100 a 1000 vezes..Os microscópios compostos ou microscópios comuns, a lente objetiva produz uma imagem real dentro de um tubo próximo da lente ocular. Esta é usada para examinar a imagem já aumentada, como se fosse olhar um objeto. Ambas, objetiva e ocular contribuem para o aumento total do microscópio. Portanto a ocular é uma lente que serve para aumentar ainda mais a imagem produzida pela objetiva, assim para uma ocular de 10 X, conjugada com uma objetiva de 30 X, o aumento será de 300 X (BISCEGLI et al., 1997).

O microscópio eletrônico surgiu em 1932, sendo rapidamente aperfeiçoados, os mais atuais permitem aumentos de 5 mil a 500 mil vezes. A diferença entre os microscópios óptico e eletrônico é que neste último não é utilizada a luz, mas sim feixes de elétrons, nestes não há lentes de cristal e sim bobinas, chamadas de lentes eletromagnéticas. Estas ampliam a imagem gerada pela passagem do feixe de elétrons no material e a projetam para uma tela de um monitor branco e preto onde é formada uma imagem de pontos mais ou menos brilhantes e não é possível observar material vivo neste tipo de microscópio.(POHL et al., 1984). O material a ser estudado passa por um complexo processo de desidratação, fixação e inclusão em resinas especiais, muito duras, que permitem cortes ultrafinos, obtidos através das navalhas de vidro de um ultramicrotomo.

Os instrumentos ópticos possuem a limitação do comprimento de onda da luz visível. Um microscópio eletrônico de varredura SEM (Scanning Elétron Microscope), somente é capaz de trabalhar em vácuo, com resolução de escalas nanométricas ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), mas em geral, com efeitos destrutivos para a amostra. Além disso, não dão boa informação sobre profundidade. O microscópio de varredura por sonda, ou SPM (Scanning Probe Microscope) é na realidade composto basicamente de sonda e um sistema de cerâmicas piezoelétricas (cerâmica piezoelétrica é a cerâmica cuja dimensão varia em função da diferença de potencial aplicada sobre a mesma). A imagem é obtida

pela movimentação da sonda em relação a amostra em estudo. O movimento é controlado por sistema de realimentação PID (Proporcional Integral Diferencial). Durante as varreduras as informações do sistema de controle e do detector de posição da sonda são utilizadas para construir a imagem da amostra. Há diversos tipos de microscópios de sonda, o de tunelamento ou STM (Scanning Tunneling Microscope) (BINNING et al., 1982), o de força atômica ou AFM (Atomic Force Microscope) e, também, o de campo próximo ou SNOM (Scanning Near-Field Optical Microscope). O mais usado é o AFM cuja sonda é formada por uma haste com uma agulha em sua parte inferior, o cantiléver¹. Para o STM é usado um fio de platina, com este é possível obter-se imagens de amostras com magnificações elevadas, podendo chegar a dimensões nucleares. Resoluções de até 0,1 ângstrom são reportadas na literatura (BINNING et al., 1986).

O STM foi desenvolvido por Gerd Binnig et al. (1982), e foi o primeiro instrumento capaz de gerar imagens reais de superfícies com resolução atômica. Em 1986, Binnig e ROHRER ganharam o Prêmio Nobel de Física.

O STM pode ser utilizado para estudar a topografia de materiais condutores em escala nanométrica em escala atômica (HERRMANN et al., 1997; LEITE e HERRMANN, 2005). Podem ser feitas ainda muitas outras investigações derivadas do potencial de medida das duas anteriores.

A partir de uma modificação do microscópio de tunelamento, combinado com um profilômetro *Stylus*² Binnig et al. (1986) desenvolveram o AFM.

2 Material e Métodos

O modelo de instrumento para acoplamento de câmera fotográfica ou cinematográfica digital a microscópio óptico desenvolvido por Novaes et al. (2007). Este dispositivo fixa a câmara na lente ocular do microscópio, possibilita obter fotografias de imagens microscópicas, de materiais em lâmina apropriada, ou mesmo filme desse material (Figura 1). Os microscópios ópticos aumentam a imagem em 100, 200, 400 e 1.000 vezes. Com o acoplamento de uma câmera digital, onde acionando-se o zoom, aumenta-se a imagem sem distorção em, dez, vinte vezes ou mais, melhorando com isto a visualização e o diagnóstico.

O acoplador de câmeras é constituído de um anel metálico de 35 mm, de diâmetro interno, com 15 mm de altura e parede de 6 mm (Figura 1), com três parafusos de 5 mm equidistantes, que fixam o equipamento à lente ocular do microscópio (Figura 2). Presa ao anel por um parafuso de 6mm (Figura 2a/04), há uma cantoneira medindo 20 mm por 40 mm de comprimento, com 3 mm de espessura e 20 mm de largura. Esta tem um furo oblongo de 25 mm de

¹Cantiléver é a denominação que recebe o conjunto formado pela haste e agulha de varredura do microscópio de força atômica.

²Aparelho para medir rugosidade em escala microscópica.

comprimento e 6 mm de diâmetro ao qual adapta-se outra cantoneira com um parafuso de 6 mm (Figura 2a/03), isto permite ajustar a altura da câmara ao centro da lente ocular do microscópio para obter-se a imagem. Esta cantoneira é metálica com 3 mm de espessura, 200 mm de comprimento e 20 mm de largura e contém um furo oblongo de 25 mm de comprimento e 6 mm de diâmetro (Figura 2a/05), que fixa com um parafuso de 6 mm uma câmera digital amadora (Figura2a/06), qualquer que seja o seu tamanho, exceto as câmeras profissionais que são mais pesadas.

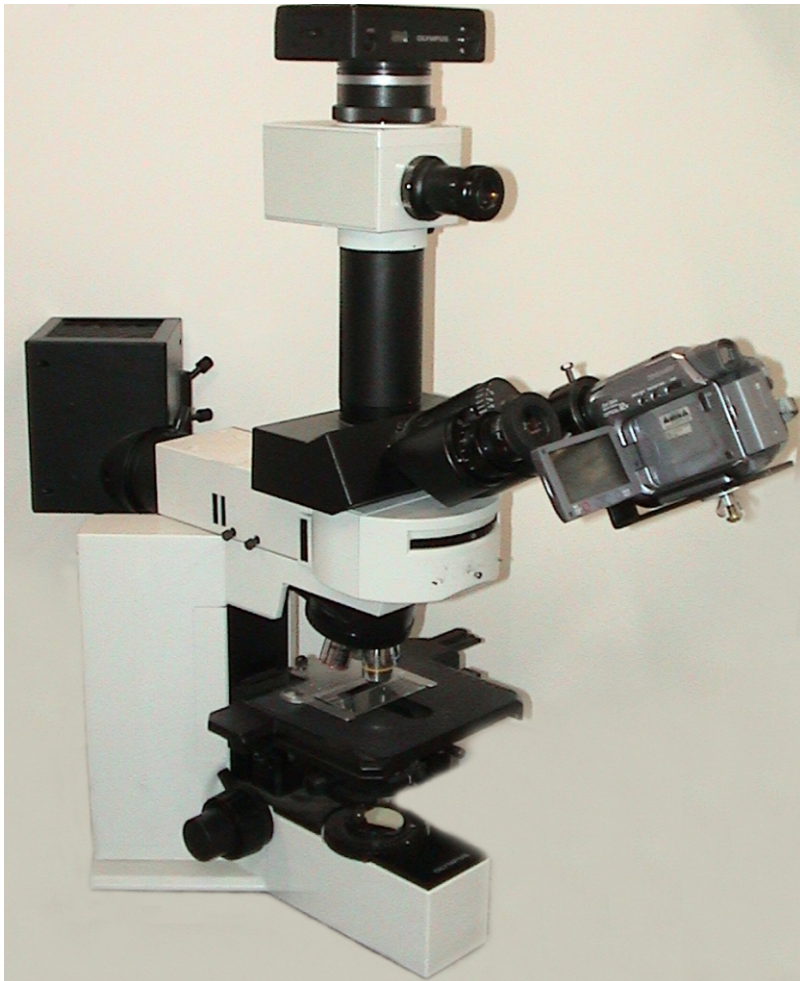
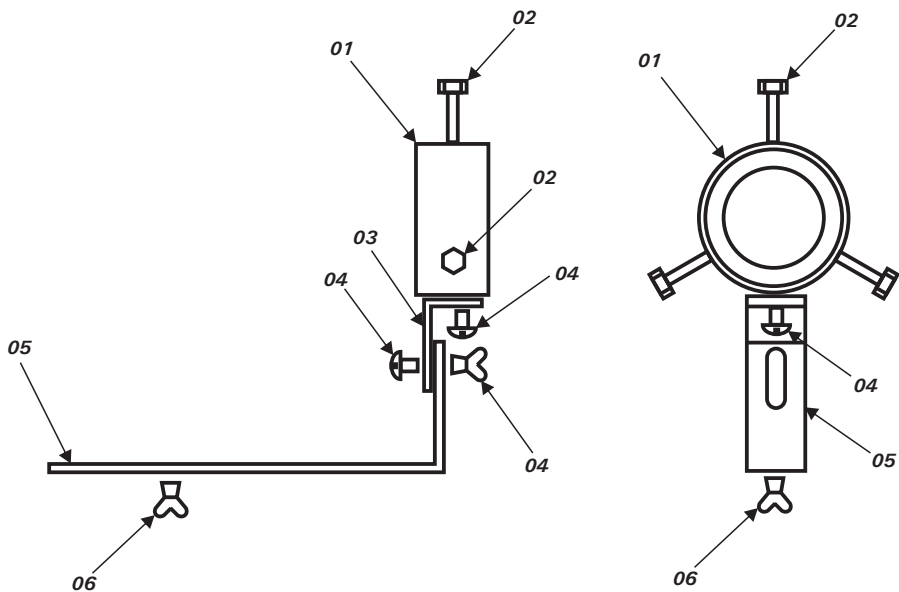


Figura 1 - Acoplamento de câmera digital ao microscópio, estando essa presa à ocular pelo acoplador.



(a)

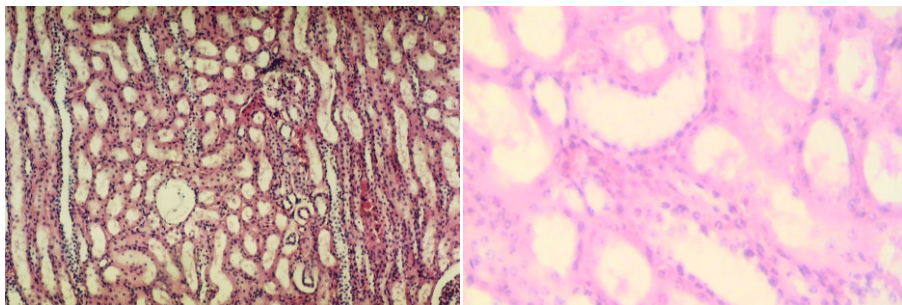


(b)

Figura 2 - a) Esquema básico do acoplador de câmeras digitais ao microscópio óptico. b) Versão construída do acoplador.

3 Resultado

O resultado pode ser observado nas Figuras 3a, 3b e Figura 4, onde são comparadas as imagens feitas em microscópio óptico com aumento de 100 vezes e a mesma imagem obtida em câmara digital com aumento de 100 vezes, mais 20 vezes o zoom, perfazendo um total de 2.000 vezes. Assim detalhes do material examinado podem ser melhor observados, facilitando o diagnóstico. Outro exemplo é mostrado na Figura 5.



(a)

(b)

Figura 3 - a) Fotomicrografia do mesmo corte histológico de rim, obtido com câmara digital, com aumento de 100 X Mais 20 X o zoom da câmara. b) Fotomicrografia do mesmo corte histológico de rim, obtidos com máquina fotográfica digital, com aumento de 100 X Mais 20 X o zoom da máquina fotográfica.

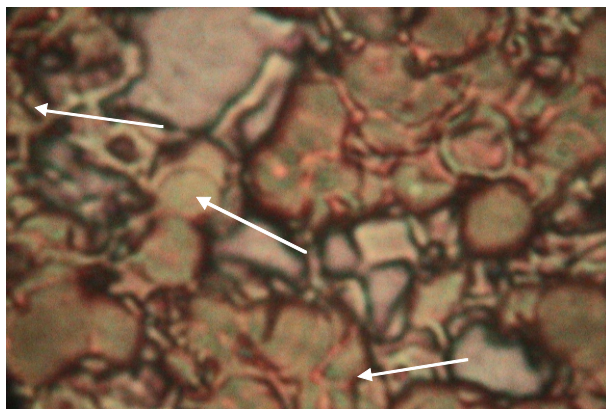


Figura 4 - Fotomicrografia de esfregaço de sangue periférico de ser humano, visualizando-se microfílaras de *Stephanofilaria* spp, com aumento de 4.000 X, através do zoom de câmara digital acoplada ao microscópio óptico.

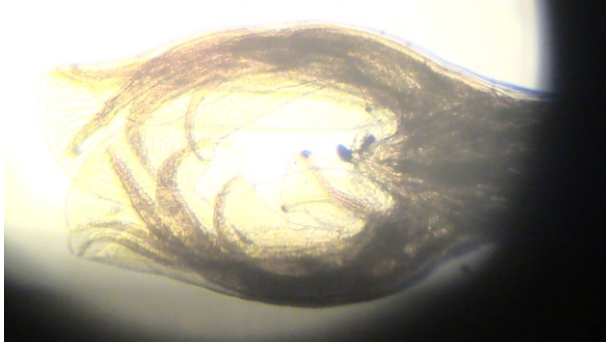


Figura 5 - Fotomicrografia da bolsa copuladora de *Haemoncus contortus*, obtida com câmera digital (aumento de 2.000X).

Com auxílio de um cotonete foi impresso em lâmina, material coletado da mucosa nasal de uma pessoa com resfriado. Esse foi fixado com álcool metílico e levado ao microscópio com aumento de 400 X mais 20 X O zoom da câmera. Regulando-se a iluminação, foi possível visualizar-se então, imagem semelhante ao vírus do resfriado (Figura 6a). Essa lâmina foi submetida ao microscópio de força atômica, que com aumento de 8.000 X revelou as mesmas imagens obtidas com a câmara digital (Figura 6b). Para confirmar a magnitude dessas essas imagens, fotografou-se a grade de calibração do microscópio de força atômica, os resultados estão nas imagens obtidas com epi-iluminação, nas Figuras 7a e 7b.

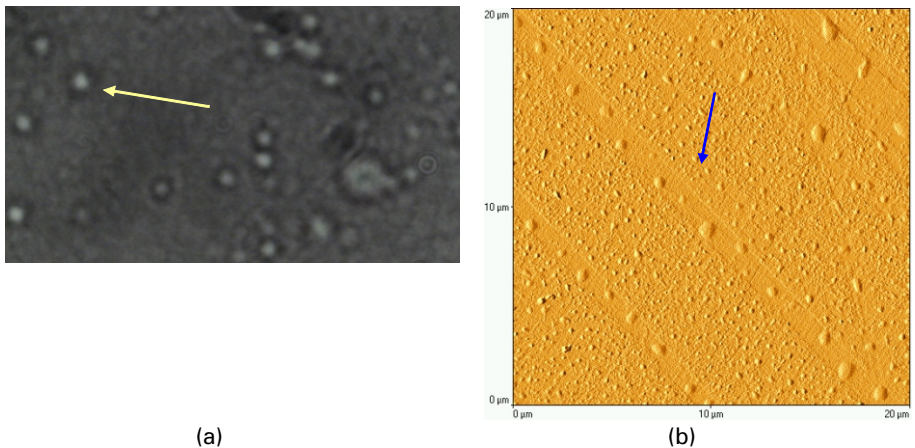


Figura 6 - a) Fotomicrografia de vírus do resfriado obtido em microscópio óptico com câmera digital, com aumento de 100 X mais 100 X o zoom da câmera. b) Fotomicrografia obtida em microscópio de força atômica, visualizando-se imagens do vírus do resfriado, imagem aumentada em 10.000 X.

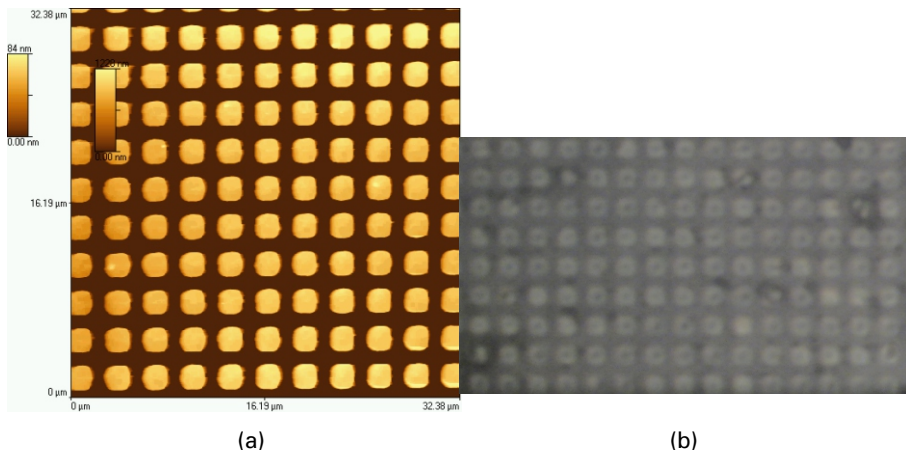


Figura 7 - a) Fotomicrografia da grade de calibração do microscópio de força atômica, obtida com aumento de 8.000 X, no microscópio de força atômica. b) Fotomicrografia da grade de calibração do microscópio de força atômica, obtida com epi-iluminação, com aumento de 8.000 X, com auxílio do zoom da câmera fotográfica digital.

4 Conclusão

O equipamento para acoplamento de câmaras digitais em microscópio óptico, permite a tomada de imagens ampliadas ou não, conforme pode ser observado nas Figuras 3a e 3b. Isto se deve a mesma técnica utilizada para a ocular do microscópio, ou seja aumentar a imagem que já está aumentada. Permite por exemplo, obter-se imagens de microfíliárias de *Stephanofilarias spp* em esfregaço de sangue periférico de seres humanos, observadas somente com aumento de 2.000 a 4.000 vezes (NOVAES e MIYASHIDA, 2006) (Figura 4) e imagem de bolsa copuladora de *Haemoncus contortus* com aumento de 2.000 vezes (Figura 5). Essa técnica pode ser útil no diagnóstico de afecções, incluindo as virais, bastando adequar a iluminação. Para materiais não-translúcidos deve-se utilizar epi-iluminação.

5 Referências

BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. H. Atomic Force Microscope. **Physical review letters**, New York, v. 56, n. 9, p. 930-933, 1986.

BINNING, G.; ROHRER, H.; GERBER, C.; WEIBEL, E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. **Physical review letters**, New York, v. 49, n. 1, p. 57-61, 1982.

BISCEGLI, C. I.; RABELLO, L. M.; CRUVINEL, P. E.; HERRMANN JUNIOR, P. S. de P.; FERREIRA, W. S. **Manutenção de instrumentos laboratoriais na pesquisa agropecuária**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1997. 273 p.

HERRMANN, P. S. P.; SILVA, M. A. P. da.; BERNARDES FILHO, R.; JOB, A. E.; COLNAGO, L. A.; FROMMER, J. E.; MATTOSO, L. H. C. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: ciência e tecnologia**, São Carlos, SP, v. 7, n. 4, p. 51-61, 1997.

LEITE, F. L.; HERRMANN JUNIOR, P. S. P. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review. **Journal of Adhesion Science and Technology**, Utrecht, v. 19, p. 365-405, 2005.

NOVAES, A. P. de; HERRMANN, P. S. P.; BERNARDES FILHO, R.; BENETTI, F. M. Equipment for coupling a digital camera to an optical microscope. In: MODERN Research and Education Topics in Microscopy. Badajoz: [s. n.], 2007. (Microscopy Book).

NOVAES, A. P. de; MIYASHIDA, A. Y. **Estefanofilariose, vetores e mecanismo de transmissão**: uma nota preliminar. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2006. 11 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Documentos, 22).

POHL, D. W.; DENK, W.; LANZ, M. Optical stethoscopy – image recording with resolution $\lambda/20$. **Applied physics letters**, New York, v. 44, n. 7, p. 651-653, 1984.

SYNGE, E. H. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. **Philosophical Magazine**, London, v. 6, p. 356–362, 1928.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Instrumentação

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP

Telefone: (16) 2107 2800 - Fax: (16) 2107 2902

www.cnpdia.embrapa.br - sac@cnpdia.embrapa.br

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

