

MICROSCOPIA OPERACIONAL

Por J. H. GAISER

Método correto e prático para uso do microscópio em todos os tipos de observação, normal, contraste de fase, campo escuro, microfotografia, projeção e desenho. Sequência de operações de regulagens e ajustagens que devem ser observadas na ordem dada para a obtenção do máximo do rendimento da aparelhagem em uso.

1. Coloque sobre a platina do microscópio uma lâmina que esteja perfeitamente limpa, isto é, cujas superfícies estejam isentas de Bálsamo ou poeira ou impressões digitais. Usar de preferência benzina ou éter sulf. Para essa limpeza.

2. Focalize a lâmina, de preferência, com uma objetiva de aumento fraco, de mais ou menos 10 x.

Iluminação Natural

3. Use o espelho plano, nunca o concavo, porque o mesmo não permite focalizar o condensador no plano da lâmina.

4. Pelo movimento em altura do condensador (pinhão e cremalheira) e com auxílio do espelho plano, projete uma imagem de um objeto distante no plano da preparação, isto é, que a mesma seja vista junta com os contornos (estrutura) do preparado que está sobre a lâmina. O alvo escolhido pode ser uma árvore, o telhado de um a casa, fios elétricos, uma lâmpada de teto, etc... Por meio dessa regulagem conseguimos o que se chama focalizar o condensador no plano de preparação.

5. Procure agora, movendo o espelho plano uma área de iluminação homogênea, por ex.:uma parte do céu sem nuvens ou uma área bem iluminada eletricamente, eliminando assim a imagem do objeto distante, que apenas serviu para focalizar o condensador e agora não mais interessa

6. Se não for possível achar uma área de iluminação por igual, então introduza no porta filtro do condensador um filtro branco fosco (despolido) e no caso de lâmpada incandescente um filtro azul fosco. Assim todo campo de observação fica homoganeamente iluminado. O filtro despolido tem uma estrutura pela sua granulação mais fina ou mais grossa, que introduza no porta filtro do condensador fica no infinito em relação à preparação onde desaparece por completo não interferindo na imagem da lâmina.

7. Ajustagem da iluminação fornecida pelo condensador (cone de iluminação) pela Lei de ABBE.

8. Artificio para proceder com rigor essa ajustagem: Retire a ocular do microscópio e observe a lente trazeira da objetiva onde aparece a imagem nítida do diafragma do condensador e que agora pode ser regulado com precisão levando em consideração o seguinte critério:

a) Lâminas a fresco (não coradas) – Usar o diafragma do condensador igual a 2/3 da abertura do diafragma da Objetiva

b) Lâminas coradas – Usar o diafragma do condensador igual ao diafragma da objetiva

Iluminação Artificial

9. Pelo princípio de iluminação Seg. Prof. KOEHLER, também conhecido como "Iluminação racional do microscópio". Esse princípio consiste fundamentalmente na projeção da imagem da fonte luminosa no plano do diafragma do condensador, ou seja, na entrada do microscópio para formar novas imagens da fonte, no plano de imagem primária do microscópio (plano focal posterior da objetiva) e ainda no plano da pupila do olho observador, de onde ilumina, de modo ideal o fundo do olho.

10. Só é possível realizar rigorosamente esse princípio de KOEHLER com uma boa lâmpada de microscopia que esteja provida de coletor (lentes coletoras) para a projeção do filamento da lâmpada, de diafragma de campo, de bulbo de filamento concentrado e uniforme e de dispositivo de centragem e focalização do filamento. A lâmpada deve ser montada sobre a estatíva ajustável em altura e inclinação Ter transformador variável para a ligação em rede elétrica.

AJUSTE PRÉVIO DA LÂMPADA

11. A distância de 20 a 30 cm (mais ou menos um palmo), coloque um enteparo e focalize o filamento da lâmpada sobre esse plano atuando sobre o dispositivo que permite variar a distância da lâmpada em relação ao coletor. Coloque a lâmpada em frente ao microscópio e ajuste a direção a inclinação da mesma de um modo macrométrico.

12. Feche o diafragma de campo (da lâmpada) e, pelo movimento combinado do espelho plano e do movimento em altura do condensador, projete a imagem do diafragma de campo no plano da preparação, onde os bordos do diafragma devem parecer nítidos.

13. Centre a imagem pelo espelho (no caso das lâminas de microscopia embutidas na base, por ex. no microscópio Zeiss Standard etc. centre a imagem pelos parafusos de centragem do condensador)

14. Abra o diafragma até ficar no mesmo tamanho do bordo do campo do microscópio. Finalmente teste as perfeitas condições de ajustagem do princípio observando, com o auxílio de um pequeno pedaço de papel a imagem do filamento da lâmpada projetada sobre o espelho e na altura do diafragma do condensador, onde deverá estar centrada e iluminar toda a área do diafragma.

15. O diafragma da lâmpada, assim prestou os três seguintes trabalhos importantes que são:

a) permite a focalização do condensador no plano da preparação (os bordos das palhetas do diafragma nítidos)

b) centragem do eixo ótico de iluminação para o eixo ótico de observação e faz, finalmente uma separação perfeita entre a luz que forma a imagem e a luz que passa por

fora. Separa a luz útil da inútil, aumentando assim o contraste dos contornos e combatendo o halo que em geral existe sobre a imagem.

Assinala ainda que, graças à condução da imagem da fonte luminosa através do microscópio, obtemos uma importante vantagem que é o mínimo de aquecimento da lâmina (luz paralela na preparação) combinada com máximo de iluminação da imagem da preparação (devido a projeção da fonte no plano focal posterior da objetiva). Essa vantagem é muito importante na projeção de lâminas

16. Introduza no porta-filtro do condensador um filtro azul despolido.

17. Ajuste a LEI DE ABBE como já vimos, ou seja, o cone de iluminação que deve ser igual ao cone de luz captado pela objetiva no caso de lâminas coradas, e de apenas 2/3 no caso de lâminas a fresco (vivas).

AJUSTAGEM DO MICROSCÓPIO PARA OBSERVAÇÕES EM

Contraste de Fase

18. Obedeça rigorosamente as prescrições de princípio de iluminação racional Seg. KOEHLER. Assim destacamos como sendo 2 principais seguintes:

a) O condensador deve estar focalizado em relação a lâmina.

b) A fonte luminosa, isto é , a sua imagem real deve estar situada no plano do diafragma do condensador ou seja, na pupila de entrada do microscópio.

19. Satisfeitas essas 2 condições básicas de iluminação em microscopia, devemos usar as objetivas especiais de fase Ph que serve também para observações em campo claro e as objetivas secas Ph para observação em campo escuro inclusive. As objetivas são identificadas pelos aumentos de números.

Assim PH 10x ou Ph 1 PH 40x ou Ph 2

PH 16x ou Ph 1 PH 63x ou Ph 3

PH 25x ou Ph 1 PH 100x ou Ph 3

Todas as objetivas de fase tem montadas internamente um anel (placa de fase) que aparece olhando através das lentes da objetiva.

O condensador da fase, nada mais é do que um condensador comum, Seg. ABBE simplificado ou completo (também para luz oblíqua) e que se difere apenas porque possui um disco revólver com diversos diafragmas em forma de anéis e identificados pelos aumentos com que trabalham ou os números como acima foi demonstrado.

20. Para entrar em fase, basta girar o disco do condensador para o número gravado na objetiva. Devido as tolerâncias de fabricação e as condições da lâmina (que pode ser cuneiforme) utiliza-se um dispositivo que pode ser um auxiliar de ajuste que é o microscópio auxiliar. Pelo movimento da ocular desse microscópio procura-se focalizar

bem o campo, não procure a focalização pelo movimento macrométrico e micrométrico do microscópio propriamente dito. Devem aparecer nítidos 2 anéis, um claro (fonte luminosa focalizada no condensador) e um escuro (placa de fase na objetiva).

21. Pelo movimento das alavancas de ajuste do disco revólver do condensador executamos a coincidência perfeita dos dois anéis.

22. Substitua agora o microscópio auxiliar pela ocular do microscópio. O campo que aparecerá está em contraste de fase cuja maior ou menor luminosidade regulamos pelo reostato do transformador ou pela retirada ou colocação de filtros no porta-filtro do condensador.

23. Ajuste de campo escuro com dispositivo de contraste de fase. As objetivas secas fracas de 2,5x até 25x, podem trabalhar em campo escuro, quando o diafragma de fase do condensador de imersão ou seja o n.º 3

ILUMINAÇÃO EM CAMPO ESCURO

24. Observe o princípio de iluminação de KOEHLER, que se constitui pela projeção do filamento na entrada do condensador.

25. O condensador de campo escuro pode ser feito do tipo seco ou de imersão, conforme o aumento que se deseja obter. Assim o condensador seco é mais usado em aumentos com objetivas até 40x, podendo alguns trabalhar também com objetiva de imersão, com dispositivo especial. Os condensadores de campo escuro são de 2 tipos, os parabólicos e os cardióides. Fornecem iluminação para as objetivas acima de 40x até às de imersão, quando estas são previamente diafragmadas até 0,8 a.n. por diafragma incorporado ou pequeno tubo introduzido no sistema ótico. Os campos obtidos são bem negros, dependendo dessa qualidade porém na limpeza do condensador das lâminas usadas e do óleo de imersão sujo ou com bolhas de ar.

26. O condensador é montado em lugar do condensador de campo claro e com uma objetiva de aumento fraco, por ex. 10x procure centra-lo pelo dispositivo de anéis excêntricos ou pelos parafusos de centragem próprios para esse fim. Nos condensadores que não tem dispositivos de centragem, use o movimento do espelho para centralização do feixe luminoso. Para maior facilidade de centralização, do campo luminoso no campo pode ser usado um vidro porta objeto despolido numa face, tanto no condensador seco como no de imersão. A intensidade luminosa no campo é regulada pela elevação ou abaixamento do condensador em limites pequenos. Quando há dificuldades na obtenção de um bom campo escuro, deve se lembrar que as lâminas de grossura ideal, são de mais ou menos 1 mm de espessura, principalmente no caso de campo escuro de imersão. Use lâmpadas de microscopia reguláveis que permitam alta intensidade luminosa.

AJUSTAGEM DA APARELHAGEM PARA OBTENÇÃO DE

IMAGENS DE LUMINISCÊNCIA (FLUORESCÊNCIA)

27. O problema fundamental da fluorescência é excitar pela iluminação os fluorocromos usados para corar as preparações e examinar as radiações luminosas provenientes dessa

excitação, fazendo uma separação perfeita da luz excitante. Assim é necessário que se adote um sistema de iluminação muito rico em radiação ultra - violeta para os quais se prestam muito bem os queimadores de quartzo de altíssima pressão, por ex. HBO 50, HBO 80, HBO 200, HBO 500. A escolha do queimador mais adequado é regido pela sua intensidade luminosa por ex. Para trabalho gerais o HBO 200. As lâmpadas de arco voltaicos por carvão são também boa fonte de luz ultra - violeta. A luz gerada pela lâmpada de quartzo atravessa o filtro excitador BG ou Ug que é concentrada na entrada do condensador. Observe sempre com cuidado as prescrições de KOEHLER. Junto com a luz excitante sobe a luz gerada pelos fluorocromos e atravessam a objetiva ocular. Nesse ponto é introduzido o filtro supressor de barragem de luz excitante e segue agora apenas para a observação a luz gerada pelos fluorocromos.

28. Na imuno - fluorescência usa-se para a melhor observação da fluorescência específica os condensadores de campo escuro, exatamente como vimos anteriormente

ILUMINAÇÃO EM LUZ POLARIZADA

29. Para obter resultado satisfatório observar a iluminação de KOEHLER. O conjunto de polarização, para fins biológicos, consiste das seguintes peças: O polarizador P, o analisador A, e os compensadores R1 ou $\frac{1}{4}$ -Lambda. Ajuste o microscópio como vimos o item 9 até 17. O analisador A é montado sob a ocular e o polarizador P é colocado no porta- filtro do condensador. Pelo giro do analisador A obtenha um campo claro que vai escurecendo até ficar bem escuro. Se continuar o giro o campo começa a ficar novamente claro. A posição de trabalho é o campo mais escuro possível. Nessa posição os eixos (assinalados nos filtros por linha brancas nos suportes) estão em posição cruzadas. As substâncias que tem caráter bi- refrigente e que agora são trazidas ao centro Com auxílio do charriot, apresentam um aclaramento de acordo com a posição relativa no campo que varia de intensidade luminosa se girarmos a preparação (os microscópios próprio de polarização tem platina giratória) ou apresenta uma cruz característica sobre a sua imagem identificando o seu estado bi- refrigente . o filtro compensadores R1 ou $\frac{1}{4}$ Lambda, introduzido no trajeto ótico do microscópio, é colocado sob, isto é, por debaixo do filtro analisador A, ou sobre o filtro polarizador P. Quando a marca do seu eixo coincide com o eixo analisador A ou polarizador P, o campo se apresenta com um contraste escuro, isto é neutro como se o filtro R1 ou $\frac{1}{4}$ Lambda não tivesse sido colocado no caminho ótico. Existem 2 posições, que indicam a posição de trabalho dos filtros R1 $\frac{1}{4}$ Lambda, que é 45.º cruzando os feixos dos filtros polarizados P e A. O campo fica claro e os fenômenos de polarização sensibilizados.

MÉTODO E TABELA DE EXPOSIÇÃO PARA

MICROFOTOGRAFIA

30. Para as medições das luminosidades podem ser utilizados diversos fotômetros, que devem Ter boa sensibilidade. Usamos um fotômetro WESTON MASTER adaptado por uma peça intermediária ao tubo monocular do microscópio, porém sem a ocular. A câmara que usamos é da marca Zeiss adaptado ao tubo monocular do prisma de reflexão e ocular especial fotográfica de 9x. Os valores de exposição foram obtidos por experiência com um filme de sensibilidade média de 18-19 DIN ou 40-50 ASA. Indicação do fotômetro:

LIGHT Value	Tempo de exposição
0,2	2 seg.
0,4	1 seg. OBS:
0,8	1 / 2 seg. Filme de 40 - 50
1,6	1 / 5 seg. ASA
xx 3,2	1 / 10 seg. com ocular de 9x
6,4	1 / 25 seg.
13	1 / 50 seg

Para obter resultados satisfatórios, tanto em preto e branco como colorido (luz tungstênio) deve se usar a lâmpada de microscopia com a voltagem nominal, isto é no caso de 6V o reostato ou a posição da tomada devem estar ajustadas para essa voltagem ou acima da mesma para obter necessária temperatura de cor. Para obter absoluto êxito nas microfotografias preto e branco e principalmente nas coloridas é necessário observar á rigor o princípio de iluminação seg. o Prof. Koehler. Garante esse princípio distribuição homogênea da luz na preparação, isto é, a mesma intensidade luminosa em todos os pontos do campo, combatendo eficientemente o halo sobre a imagem e aumento assim o contraste dos contornos das extruturas das preparações. Devido as tolerâncias na sensibilidade dos filmes empregados e também nas pequenas diferenças existentes na aparelhagem empregada em microfotografia é necessário que cada observador estabeleça a tabela certa para o seu equipamento, a fim de que possa a qualquer tempo tira microfotografia perfeitamente expostas. Esse trabalho se faz necessário e é feito apenas uma vez por ocasião da instalação do material. Uma vez determinadas as tabelas, as mesmas são válidas em qualquer tempo a mesma marca do filme. Usar por esta razão sempre filmes de boas marcas e que se encontram com facilidade nas casas do ramo. O que se segue constitui uma maneira de estabelecer a tabela e que é valida para qualquer um equipamento usado nas mais diversas combinações . Existem também as aparelhagens automáticas de microfotografias. Tanto uma como as outras devem ser uma vez ajustadas, isto é, deve- se encontrar um valor base de calibração para as demais medições das luminosidades. Assim mostraremos como proceder:

Ao medir a luz pelo fotômetro procura- se o valor base, executando sempre com a mesma luminosidade, isto é, com a mesma leitura do fotômetro diversas exposições da seguinte forma:

Por ex. o fotômetro acusa a leitura de 3,2, então tira-se algumas fotografias com as seguintes exposições:

3,2 1 / 2 seg.

3,2 1 / 5 seg.

3,2 1 / 10 seg.

3,2 1 / 25 seg.

3,2 1 / 50 seg.

Manda-se revelar essa tira de filme de prova (calibração) e pelo exame do negativo pode-se saber qual a microfotografia corretamente exposta. As fotografias super-expostas e as sub- expostas podem ser facilmente reconhecidas. Assim achamos por ex. para a melhor exposição o Seg. tempo de exp.:

3,2 1 / 10 seg.

Que é o nosso valor base da tabela

Este valor permite fazer uma tabela, considerando que as indicações do fotômetro são respectivamente o dobro ou a metade de cada metade de cada valor.

Temos para 6,5 – mais luz, portanto o metade do tempo 1 /25 seg.

para 13 – mais luz, portanto o metade do tempo anterior ou seja 1 /50 seg.

para 1,6 – menos luz, portanto o dobro do tempo 1 / 5 seg.

para 0,8 – menos luz, portanto o dobro do tempo anterior 1 /25 seg.

para 0,4 – menos luz, portanto o dobro do tempo anterior 1 seg.

para 0,2 – menos luz, portanto o dobro do tempo anterior 2 seg.

O único cuidado que se deve observar é no uso da ocular. A ocular deve ser sempre a mesma, e naturalmente do tipo especial para fotografia para planificar bem a imagem da preparação. O fator que representa a ocular na medição da luminosidade está automaticamente computado na tabela estabelecida, porque a medição é executada sem a ocular, e portanto, a ocular faz parte da máquina de microfotografia e entra em seu conjunto.

Os filtros podem ser medidos, introduzidos ou não no trajeto de iluminação. Muitas vezes os filtros absorvem luminosidade demais e assim é mais interessante medir sem os mesmos, considerando depois o fator próprio para cada cálculo da exposição.

Os filmes coloridos devem ser usados de acordo com sua a sensibilidade tendo-se o cuidado de observar a característica principal do filme, que deve ser para a luz de tungstênio (artificial) porque a iluminação do microscópio usa lâmpada de incandescência. No caso de usar a Emulsão de Luz de Dia (day-light) não esquecer o

uso do filtro azul para a conversão de cor e a incandescência da lâmpada sempre igual a voltagem nominal ou acima da mesma.

A tabela anteriormente estabelecida pelo valor base, por ex. 3,2 – 1/10 seg. foi para um filme de gradação normal. Podemos ter filmes mais rápidos ou mais lentos do que o normal, por ex. 100 ASA para os quais a base do valor já determinado anteriormente passaria a seguinte:

3,2 - 1 / 10 seg. fica sendo: 3,2 - dobro da sensibilidade, então a metade do tempo de exposição que é 1 / 25 seg.

A tabela nova será a seguinte: para um filme de 100 ASA c/ ocular 9x:

0,2 1 seg. xx 3,2 1 / 25 seg. xx

0,4 1 / 2 seg. 6,5 1 / 50 seg.

0,8 1 / 5 seg. 13..... 1 / 100 seg.

1,6 1 / 10 seg. 25..... 1 / 25 seg.

Para um filme com a metade da sensibilidade por o KB14 14 Din

Temos 3,2 valor base = 1 / 10 Seg. fica sendo 3,2 metade da sensibilidade então o dobro da exposição que é 1 / 5 Seg. e

A nova tabela será a seguinte: para um filme de 20 ASA ou 14 Din com ocular 9x:

0,2 4 seg. xx 3,2 1 / 25 seg. xx

0,4 2 seg. 6,5 1 / 10 seg.

0,8 1 seg. 13 1 / 25 seg.

1,6 1 / 2 seg. 25 1 / 50 Seg.

Fonte: HelpLab