

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E  
BIOLOGIA

“Sistema de microscopia especular com várias ampliações para banco de  
olhos”.

Flávio Isaac

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de  
Ribeirão Preto da USP, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina  
e Biologia

RIBEIRÃO PRETO -SP

2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E  
BIOLOGIA

“Sistema de microscopia especular com várias ampliações para banco de  
olhos”.

Flávio Isaac

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de  
Ribeirão Preto da USP, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina  
e Biologia

Orientadora: Profa. Dra. Liliane Ventura

RIBEIRÃO PRETO -SP

2004

Isaac, Flávio

Sistema de microscopia especular com várias magnificações para banco de olhos – Ribeirão Preto, 2004

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2004.

Orientadora: Profa. Dra. Liliane Ventura

1. Microscópio Especular. 2. Córnea. I. Título

Data da Defesa: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### ***Banca Examinadora***

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## ***DEDICATÓRIA***

À Líria,  
por ter estado ao meu lado em todos  
os momentos, por ser tão grandiosa e  
por amá-la muito.

À Professora Dra. Liliane Ventura,  
por seu profissionalismo, seu caráter e  
por sua amizade.

Ao Professor  
Luiz Augusto Cirelli Zampieri,  
que, com toda a dificuldade do Ensino  
Médio público, mostrou-me a beleza  
da Física e sua utilidade em benefício  
do ser humano.

## *Agradecimentos*

À minha mama, Dona Cida,  
e a meus irmãos, que, apesar da distância, estão  
sempre aqui do meu lado.

Aos companheiros do L.F.O.  
e a todos aqueles que colaboraram  
para que este trabalho criasse vida.

Ao Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de  
Ribeirão Preto, pelas córneas fornecidas.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

LFO - Laboratório de Física Oftálmica

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

BO – Banco de Olhos

USP – Universidade de São Paulo

HC – Hospital das Clínicas

DFM – Departamento de Física e Matemática

FFCLRP – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

EESC – Escola de Engenharia de São Carlos

CCD – *Charged Coupled Device*

ME – Microscópio Especular

PC – *Personal Computer*

mm – milímetro

µm – micrometro

nm – nanômetro

O.P.D.-*Optical Path Difference*

F.F.T. – *Fast Fourier Transforms*

P.S.F. – *Point Spread Function*

O.S.C. – *Optical Sine Condition*

N.A. – *Numerical Aperture*

D.O.S. – *Disk Operating System*

WINDOWS – Ambiente gráfico de trabalho em computadores desenvolvido pela Microsoft Corporation.

## RESUMO

ISAAC, F. Sistema de microscopia especular com várias magnificações para banco de olhos. 2004, 150 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Foi desenvolvido um sistema de microscopia especular para Banco de Olhos, para análise de córneas “in vitro”, com várias magnificações: 20x, 30x, 63x, 136x e 204x.

O sistema foi projetado num *software* comercial ZEMAX-XE, da ZEMAX *Developmen Corporation*.

O sistema de iluminação projetado apresentou aproximadamente 60 $\mu$ m de aberração cromática, 0.8 unidades de onda (*waves*) de aberração esférica e nenhum astigmatismo.

O sistema de magnificação apresentou para as magnificações de 20x, 30x, 63x, 136x e 205x, as respectivas aberrações cromáticas:  $\pm 250\mu\text{m}$ ,  $\pm 200\mu\text{m}$ ,  $\pm 200\mu\text{m}$ ,  $\pm 300\mu\text{m}$  e  $\pm 25\mu\text{m}$ ; as respectivas aberrações esféricas: -0.6 unidades de onda, -0.6 unidades de onda, -0.5 unidades de onda, 0.025 unidades de onda, e 0.001 unidades de onda, e nenhum astigmatismo para qualquer das magnificações.

O sistema ótico montado em bancada, segundo o projeto desenvolvido apresentou as reais magnificações de 24x, 40x, 64x, 100x e 160x.

As imagens obtidas de córneas humanas “in vitro” e densidades celulares comparadas a um sistema comercial, estão em concordância de 90% para as contagens interativas das células.

Palavra – chave: Microscopio Especular, Córnea, Banco de Olhos

## **SUMMARY/ABSTRACT**

ISAAC, F. Specular microscopy system with several magnifications for eye bank. 2004, 150 p. Master Degree Dissertation – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

We have developed a specular microscopy system for Eye Banks for “in vitro” corneal analysis with several magnifications: 20x, 30x, 63x, 136x and 205x.

The optical design of the system was projected using a commercial software ZEMAX-XE, from ZEMAX Development Corporation.

The projected illumination system has presented approximately a chromatic aberration of  $60\mu\text{m}$ , a spherical aberration of , 0.8 waves and no astigmatism.

The magnification system has presented for the 20x, 30x, 63x, 136x and 205x magnifications, the respective chromatic aberrations:  $\pm 250\mu\text{m}$ ,  $\pm 200\mu\text{m}$ ,  $\pm 200\mu\text{m}$ ,  $\pm 300\mu\text{m}$  and  $\pm 25\mu\text{m}$ ; and the respective spherical aberrations: -0.6wave, -0.6wave, -0.5wave, 0.025wave, and 0.001wave and no astigmatism for any of the magnifications.

The optical bench system, according to the projected design has presented the real magnifications of: 24x, 40x, 64x, 100x and 160x.

The images of human “in vitro” corneas and the cellular density provided by the system are in good agreement with a commercial system (90% for the interactive of the cells).

Key-words: specular microscopy, cornea, eye bank

## 1 - INTRODUÇÃO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de microscopia especular com múltiplas magnificações para córneas preservadas, possibilitando não só uma avaliação mais detalhada da camada de células endoteliais como também uma avaliação da camada estromal e epitelial da córnea. A múltipla magnificação deste sistema o diferencia de todos os microscópios especulares para análise de córneas *in vitro* disponíveis no mercado e, também proporciona, através de um sistema automatizado desenvolvido pelo L.F.O., a determinação da densidade de células endoteliais e seus índices de pleomorfismo e polimegatismo<sup>(1,2)</sup>.

Existem atualmente no mercado vários modelos de microscópio especular para Banco de Olhos<sup>(3, 4, 5 e 6)</sup>, são eles:

<b>Industria</b>	<b>Produto</b>	<b>Descrição</b> (fornecida pela Indústria)
BIO – Optics <sup>(3)</sup>	LSM-2100C Vide Figura 1a	Permite a visualização da imagem do endotélio através de um vídeo-monitor onde a imagem é capturada através de uma câmera C.C.D., permite também que seja acoplado a ele máquinas fotográficas 35 mm e Polaroids. O processo de focalização do endotélio é mecânico e os softwares que possibilitam a análise endotelial e o armazenamento das imagens trabalham em ambiente D.O.S. e Windows.
	LSM-2200C/E2 Vide Figura 1b	O LSM-2200C/E2 Eyebank Specular Microscope é o microscópio especular para banco de olhos mais avançado desenvolvido pela Bio – Optics. Este microscópio oferece uma melhoria no estado-da-arte em relação ao equipamento descrito anteriormente. Possibilita a visualização de córneas preservadas em frascos ou câmaras, tem um mecanismo de movimentação XYZ e um software que permite

		a contagem e uma completa avaliação das células endoteliais, pode ainda vir acompanhado de um paquímetro digital.
Hai Labs, Inc. <sup>(4)</sup>	HAI EB-2000xyz Vide Figura 2a	Campo visual 350µm x 450µm Movimentação x-y-z Paquímetro digital (opcional) Modelo Padronizado Interface com o software EB2.00 Câmara de visualização Padronizada
	HAI EB-3000xyz Vide Figura 2b	Campo visual: 350µm x 450µm Movimentação x-y-z Paquímetro digital (opcional) Frascos e câmaras de visualização Interface com o software EB2.00
Konan <sup>(5)</sup>	EKA-98 Vide Figura 3	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Alinhamento da córnea mais simples e fácil através de movimentação XYZ e balanço giratório.</li> <li>2. Método de Multi-análise: É possível selecionar o método mais conveniente para a análise da camada de células endoteliais da córnea doada.</li> <li>3. Fenda de largura variável.</li> <li>4. Paquímetro: Micrometro digital embutido permite medir a espessura da córnea.</li> <li>5. Multi suporte para frascos preservativos. Permite a utilização de qualquer tipo de frasco preservativo presente no mercado.</li> <li>6. Design compacto.</li> </ol>

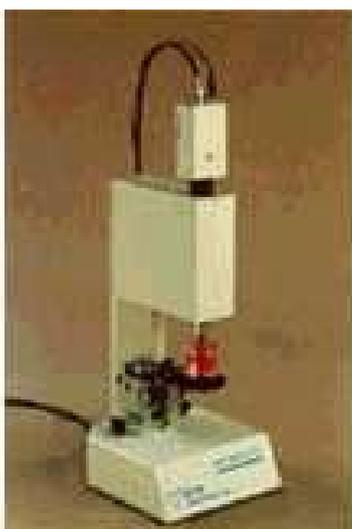


(a)

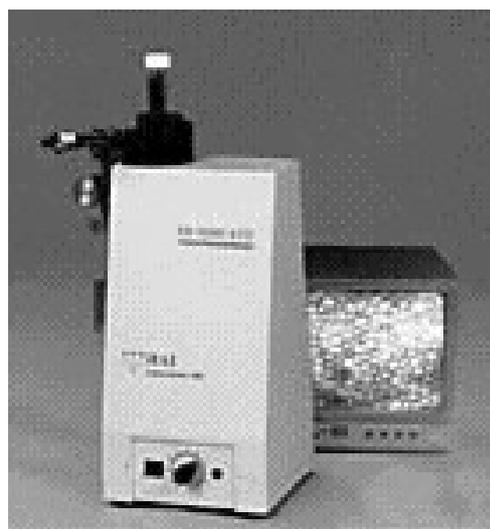


(b)

Figura 1: Microscópio Especular da BIO – OPTICS, (a) modelo LSM-2100C (b) modelo LSM-2200C/E2.<sup>(3)</sup>



(a)



(b)

Figura 2: Microscópio Especular da HAI LABS, Inc. (a) modelo HAI EB-2000xyz, (b) modelo HAI EB-3000xyz.<sup>(4)</sup>



Figura 3: Microscópio Especular da KONAN, modelo EKA-98.<sup>(5)</sup>

Todos os microscópios especulares descritos acima têm magnificação fixa em torno de 160x. O Projeto óptico destes microscópios possuem a mesma característica ótica básica, e pode ser observado na Figura 4.

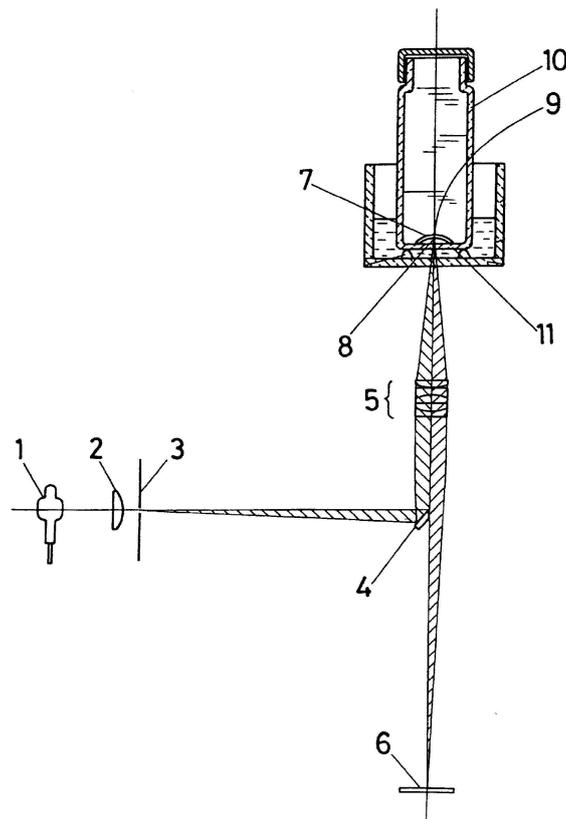


Figura 4: Projeto Óptico para um M.E. para banco de olhos.<sup>(6)</sup>

Na Figura 4 observamos um projeto óptico de um microscópio especular para banco de olhos, onde 1 é a fonte luminosa do microscópio, 2 é a lente condensadora, 3 é um anteparo com uma abertura fixa em forma de fenda, 4 um espelho que desvia o caminho óptico do feixe de luz, e 5 a objetiva do microscópio especular. Observe que o conjunto formado pela metade (esquerda de quem olha) da objetiva mais o espelho fazem o papel da lente de projeção do sistema de iluminação. A fenda é projetada sobre a superfície endotelial (8) da córnea (7), através da metade esquerda da lente objetiva, enquanto que a metade direita fica disponível para visualizar a imagem iluminada. Esta imagem é magnificada e focalizada sobre um CCD (6), que disponibiliza em um monitor de vídeo. Ainda referente à Figura 4, (9) é a superfície epitelial da córnea, (10) o recipiente em que se preserva a córnea, e (11) o líquido preservativo.

Com este microscópio especular é possível apenas observar e avaliar o aspecto da camada de células endoteliais; O objetivo deste trabalho foi desenvolver um equipamento que além de podermos observar a camada endotelial corneana fosse possível também avaliar o aspecto do estroma e do epitélio, daí a necessidade de se desenvolver um microscópio especular com múltiplas magnificações.

Para uma melhor compreensão do texto, a seguir serão detalhados os aspectos mais relevantes para este trabalho da córnea humana, princípio da microscopia especular e os métodos de avaliação de sistemas ópticos utilizados no ato da concepção do projeto óptico do microscópio especular.

## 2 - A CÓRNEA HUMANA E O PRINCÍPIO DE MICROSCOPIA ESPECULAR

### 2.1 - A CÓRNEA HUMANA <sup>(8, 9, 10)</sup>

A córnea, a parte mais externa do olho é formada basicamente por três camadas: o epitélio, o estroma e o endotélio.

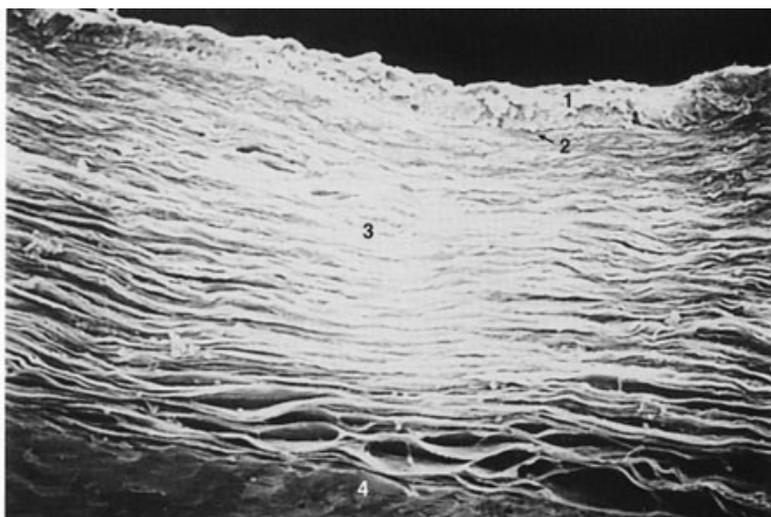
É a principal superfície refrativa do olho, constituindo-se de uma lente convergente de poder de refração (D) de 40 a 45 dioptrias, definido por:

$$D = f^{-1} \quad (1)$$

onde, f é a distância focal em metros. Assim, pode-se dizer que a córnea possui um distância focal de 2,2cm à 2,5cm.

A região central da córnea (em torno de um diâmetro de 3mm) <sup>9</sup> geralmente se apresenta como uma superfície esférica, com um raio de curvatura de aproximadamente 7,8mm. A região mais periférica da córnea é mais plana e também possui uma espessura maior, de 0,65mm (em média) contra 0,52mm (em média) da região central.

A córnea é constituída por quatro camadas (Figura 5), o epitélio, o estroma e a membrana de Bowman, a membrana de Descemet, o endotélio e eventualmente algumas literaturas descrevem o filme lacrimal como uma quinta camada.



**Figura 5: Microscopia de varredura mostrando córnea humana normal. 1) epitélio; 2) membrana de bowman; 3) estroma; 4)endotélio. A membrana de descemet não está visível no corte. Aumento de 160x. <sup>(11)</sup>**

Sendo a córnea transparente, transparência essa mantida pela camada de células endoteliais, ela refrata ondas eletromagnéticas com comprimento de onda de 310nm a 2500nm e absorve ondas no comprimento do ultravioleta (270nm)<sup>9</sup>.

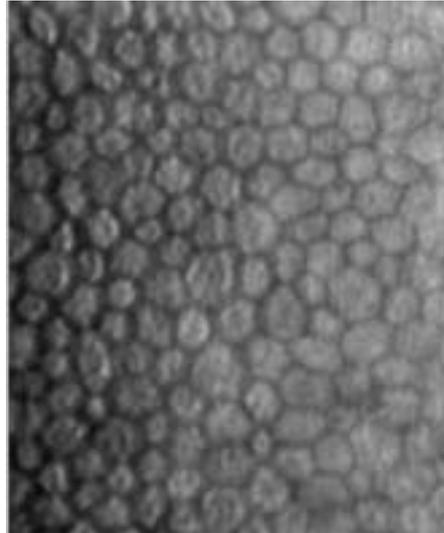
## 2.2 - O ENDOTÉLIO CORNEANO <sup>(9-14)</sup>

O endotélio corneano, Figura 6, é uma camada unicelular, na qual sua superfície se apresenta como um mosaico regular, em sua maioria com células hexagonais. Estas células revestem a superfície posterior da córnea criando uma barreira natural contra o humor aquoso. A principal função das células endoteliais é manter a transparência da córnea através de uma bomba metabólica que drena a água que o estroma tende a absorver devido às cargas dos proteoglicanos<sup>10</sup>.

Os proteoglicanos são substâncias que contêm em sua estrutura uma parte protéica e outra glicídica, eles estão presentes entre as fibrilas de colágeno estromais, sua função é manter o espaço uniforme e um tamanho determinado entre as fibrilas o que garante a transparência da córnea.

Quando há perda de células endoteliais há um movimento de fluidos e solutos ocasionando uma passagem de nutrientes incluindo glicose e aminoácidos do humor aquoso para o estroma. O movimento contínuo de água para o estroma leva a um edema estromal e à perda de transparência da córnea.

O endotélio corneano é composto por aproximadamente 400.000 células com 20µm de diâmetro e uma espessura de 4 à 6µm cada uma, em crianças a densidade de células endoteliais é de 3.500 à 4.000 células por mm<sup>2</sup>, já em adultos essa densidade cai para algo em torno de 1.400 à 2.500 células por mm<sup>2</sup>. As córneas transplantadas devem ter ao menos 1.000 células por mm<sup>2</sup>, pois o endotélio começa a perder sua função e a córnea começa a apresentar edemas quando a densidade celular se aproxima de 700 células por mm<sup>2</sup>.



**Figura 6: Células Endoteliais da Córnea Humana <sup>(11)</sup>**

Um endotélio normal, ou seja, com densidade celular adequada deve ser formado por células com forma e tamanhos regulares. Quando há perda celular o mosaico endotelial perde sua homogeneidade quanto ao formato e ao tamanho das células, a falta de uniformidade quanto ao formato das células é chamado de pleomorfismo e a falta de uniformidade quanto ao tamanho das células é chamado de polimegatismo. Tanto pleomorfismo quanto o polimegatismo são gerados pela perda celular e pela necessidade que as células possuem em preencher os espaços vazios deixados pelas que morreram.

Tanto o pleomorfismo quanto o polimegatismo refletem a perda na eficiência do mecanismo de bomba bioquímica que mantém o conteúdo aquoso constante, com o estroma em um estado relativamente desidratado e bloqueia as propriedades osmóticas dos proteoglicanos estromais hidrofílicos.

### 2.3 – A MICROSCOPIA ESPECULAR <sup>(3, 12–14)</sup>

A principal preocupação quando se avalia o tecido corneano antes de uma cirurgia, ou antes, de seu uso em transplante está em avaliar a qualidade do endotélio corneano, que é o principalmente responsável pela manutenção da transparência da córnea. O endotélio corneano reflete pressões e tensões sofridas pela córnea gerando mudanças na sua morfologia celular, assim, qualquer mudança morfológica vista no endotélio é sinal do seu estado atual.

A Microscopia Especular é um método de avaliação que permite a clínicas e Bancos de Olhos a observação direta do endotélio corneano. Em muitos aspectos, as informações obtidas com a microscopia especular do endotélio é semelhante às obtidas por um Microscópio Eletrônico de Varredura, e por fazer a observação do endotélio por reflexão, tem a vantagem distinta de permitir a observação em córnea *in vivo* sem infligir qualquer dano a ela, podendo ainda serem feitas na mesma córnea análises consecutivas para observar as mudanças morfológicas que ocorrem com o passar do tempo.

A Microscopia Especular utiliza um conjunto de técnicas baseadas na lei de reflexão especular da luz para observação de objetos com dimensões muito reduzidas. Estes princípios ópticos e a avaliação do endotélio corneano serão descritos a seguir.

### 2.3.1 - AS LEIS DE REFLEXÃO E REFRAÇÃO <sup>(15 - 17)</sup>

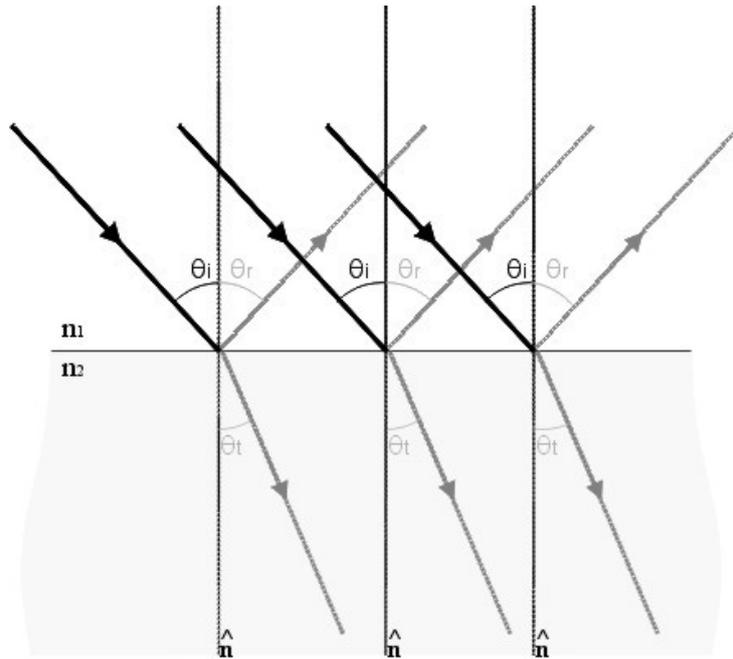
Quando um feixe de luz incide sobre a interface plana que separa dois meios com índices de refração diferentes,  $n_1$  e  $n_2$  respectivamente, uma parte deste feixe será refratada e a outra será refletida, Figura 8.

Uma superfície especular é uma superfície em que qualquer irregularidade presente nela, por maior que seja, tem uma dimensão menor que o tamanho do comprimento de onda de um feixe de luz que incide sobre ela.

Ao incidirmos um feixe de luz sobre uma superfície especular, e tendo este feixe de luz um ângulo  $\theta_i$  em relação à reta normal à superfície, este feixe de luz será refletido com um ângulo  $\theta_r$ , onde,

$$\theta_r = \theta_i. \quad (2)$$

Na Figura 7 podemos observar que o feixe de luz refratado faz com a reta normal um ângulo  $\theta_t$ , diferente do ângulo que o feixe de incidência faz com esta mesma reta, porém, podemos observar ainda que o seno do ângulo do feixe de refração é diretamente proporcional ao seno do ângulo de incidência.



**Figura 7: Representação gráfica de um feixe de luz incidindo sobre uma interface que separa dois meios com índices de refração diferentes.**

Desta forma podemos escrever que,

$$\frac{\text{sen } \theta_i}{\text{sen } \theta_t} = \text{const.}, \quad (3)$$

esta expressão é chamada de *Lei de Snell*<sup>15</sup>, e ao utilizarmos os modelos do *princípio de Huygens*<sup>15</sup> ela poderá ser reescrita como:

$$\frac{\text{sen } \theta_i}{\text{sen } \theta_t} = \frac{n_t}{n_i}, \quad (4)$$

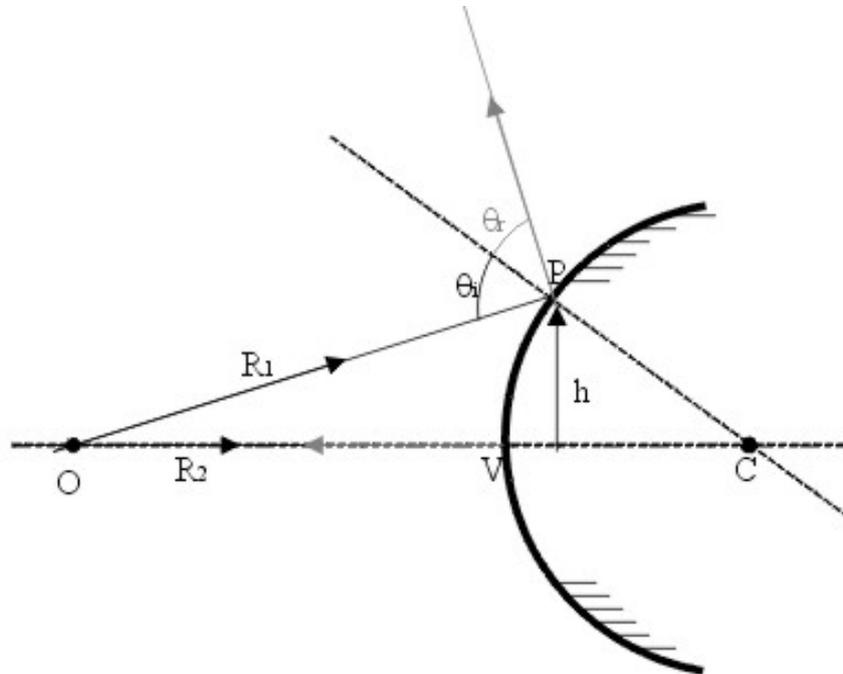
e assim,

$$n_i \text{ sen } \theta_i = n_t \text{ sen } \theta_t, \quad (5)$$

Neste ponto, desvia-se a atenção para a reflexão especular e a refração em superfícies esféricas convexas, uma vez que a superfície endotelial possui estas características.

Para superfícies esféricas convexas e espelhadas, como demonstra a Figura 8, o centro de curvatura C está do lado oposto à superfície espelhada. Podemos observar também que saem de um objeto O, a uma dada distância do espelho, dois raios de luz: o raio 1 (normal ao espelho), que atinge o vértice V do espelho e é refletido de volta; e o raio 2, que atinge o espelho num ponto

P a uma certa altura  $h$  do seu centro e é refletido com um ângulo  $\theta_r$  igual ao ângulo de incidência  $\theta_i$ .



**Figura 8: Representação gráfica da reflexão de um feixe de luz incidindo sobre um espelho esférico convexo.**

Pode-se observar que tanto o raio 1 quanto o raio 2 obedecem a lei da reflexão especular para superfícies planas.

A refração de um feixe de luz através de um meio  $n_1$  para um meio  $n_2$ , onde  $n_2 > n_1$ , e, sendo a interface entre estes dois meios uma superfície esférica convexa, as leis de refração são seguidas como para superfícies planas assim como a reflexão especular em superfícies esféricas também o são como para superfícies planas.

Serão demonstradas algumas técnicas utilizadas para explicar o comportamento do feixe de luz quando este passa de um meio para o outro através de uma interface esférica convexa (Figura 9).

Na Figura 9 podemos observar uma fonte pontual S, em um meio com índice de refração  $n_1$ , a uma distância  $s_0$  da interface esférica convexa, do meio com índice de refração  $n_2$ .

**Figura 9: Representação gráfica de um feixe de luz incidindo sobre uma interface esférica convexa, onde, esta interface separa dois meios com índices de refração diferente.**

Partem de S dois feixes de luz,  $R_1$  e  $R_2$ . O feixe 1 incide sobre a interface a uma dada altura  $h$ , uma parte deste feixe irá refletir specularmente e a outra será refratada e passará por um ponto P a uma distância  $S_i$  da interface esférica. O feixe 2 incide sobre a interface no seu vértice V, uma parte deste feixe irá refletir specularmente e a outra será refratada e também passará pelo ponto P, cruzando com a parte do feixe 1 refratada.

O princípio da reversibilidade diz que em um sistema óptico, se for invertido o sentido do feixe de luz, ele percorrerá o mesmo caminho, ou seja, se na Figura 10 os dois raios partirem de P, eles obrigatoriamente retornarão a S.

Este princípio pode ser mais bem estudado através da Figura 10, nela podemos observar um feixe de luz passando por três meios com índices de refração diferentes,  $n_1$ ,  $n_2$  e  $n_3$ , onde,

$$n_1 < n_2 < n_3.$$

Quando o feixe de luz incide sobre a interface que separa os meios com índices de refração  $n_1$  e  $n_2$ , com um ângulo  $\theta_i$  com a normal, uma parte deste feixe é refletido com um ângulo  $\theta_r$  com a normal, e a outra é refratado com um

ângulo  $\theta_t$  com a normal, onde  $\theta_i = \theta_r$ . O feixe refratado incide sobre a interface que separa os meios com índices de refração  $n_2$  e  $n_3$  com um ângulo  $\theta_{i'}$ , uma parte deste feixe é refletido com um ângulo  $\theta_{r'}$  e a outra é refratado com um ângulo  $\theta_{t'}$ , onde  $\theta_{i'} = \theta_{r'}$ .

A parte do feixe refletido na interface que separa os meios  $n_2$  e  $n_3$  incide sobre a interface que separa os meios  $n_2$  e  $n_1$ , novamente uma parte deste é refletido e a outra refratada, a parte do feixe que é refratada para o meio  $n_1$  é refratada com um ângulo  $\theta_{t''}$ , onde  $\theta_i = \theta_r = \theta_{t''}$ .

**Figura 10: Princípio da reversibilidade.**

A parte do feixe refratado na interface, que separa os meios  $n_2$  e  $n_3$  incide sobre a interface que separa os meios  $n_3$  e  $n_1$ . Novamente, uma parte

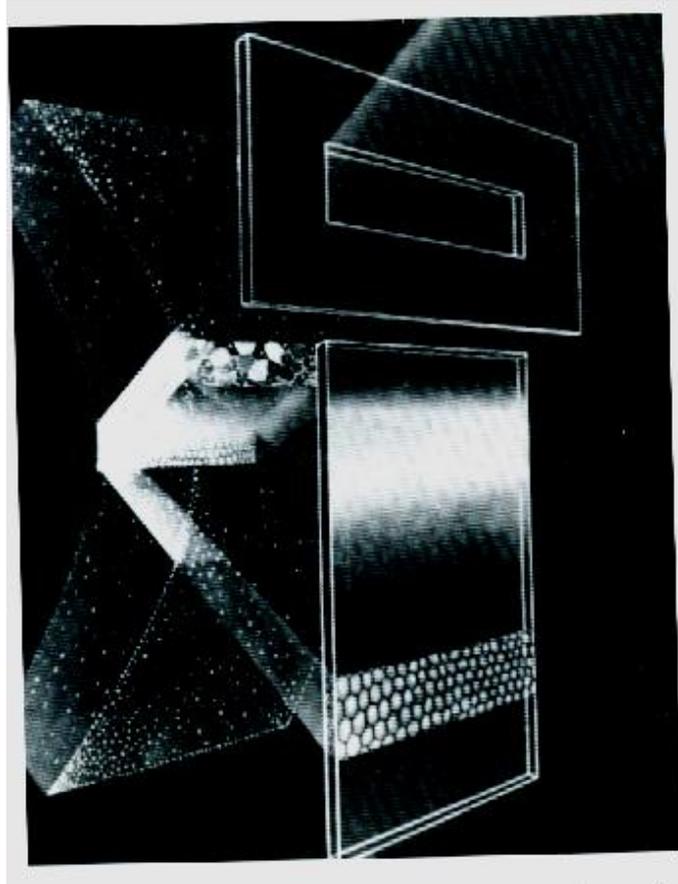
deste é refletido e a outra refratada, a parte do feixe que é refratada para o meio  $n_1$  é refratada com um ângulo  $\theta_t$ .

### 2.3.2 - REFLEXÃO ESPECULAR NA CÓRNEA <sup>(18 - 24)</sup>

A luz projetada sobre uma superfície pode ser refletida, transmitida, ou absorvida. Geralmente, ocorre um pouco dos três efeitos, com suas devidas proporções que são relativas ao comprimento de onda da luz incidente, à transparência relativa do meio abaixo da superfície de incidência e do índice de refração em cada lado da superfície. A importância primária em microscopia especular clínica é a luz que é refletida especularmente (como num espelho) onde o ângulo de reflexão é igual ao ângulo de incidência.<sup>(18)</sup>

Para uma córnea transparente normal, a maior parte de um feixe de luz, com comprimento de onda na faixa do visível, incidente sobre a superfície epitelial da córnea, é transmitida. À medida que a luz passa pelo tecido corneano, uma parte dela pode ser absorvida pelo tecido e outra pode ser refletida por fibras nervosas, ceratocitos, e outros objetos refrativos, isto é, objetos que têm um índice de refração diferente do tecido corneano. No estroma corneano normal, a maioria da luz incidente é transmitida pelo tecido, embora uma pequena quantidade seja absorvida e/ou difundida (refletida por ângulos arbitrários) através de organelas celulares. Com o aumento de edemas corneano, a fração de luz difundida aumenta e pode se tornar elemento dominante dando lugar a uma "córnea turva". No momento em que a luz incide sobre a superfície corneana posterior ela é quase que totalmente transmitida ao humor aquoso, por haver uma mudança no índice de refração na interface humor aquoso-endotélio, apenas aproximadamente 0.022 % de toda a luz incidente sobre esta superfície é refletida. É esta luz refletida que forma a imagem endotelial e é capturada pelo microscópio especular clínico.

A Figura 11 ilustra o caminho da luz, de sua fonte no microscópio especular clínico, até a parte posterior ao sensor de vídeo do mesmo instrumento.



**Figura 11: Trajetória do feixe de luz de sua fonte no microscópio especular, até o plano de imagem no CCD do microscópio. Embora esteja sendo mostrados o epitélio e o endotélio no plano da imagem, na prática só uma camada estará focada. <sup>(18)</sup>**

Embora estejam mostrados o epitélio e o endotélio focalizados no mesmo plano do sensor, na prática só uma das camadas está focalizada; isto ocorre devido à restrição causada pela profundidade de campo do microscópio especular.

À medida que o feixe de luz do microscópio especular atravessa a córnea, ele encontra uma série de interfaces entre regiões opticamente distintas. Em cada uma destas interfaces, uma parte desta luz é refletida para o microscópio especular e outra é transmitida, se aprofundando pela córnea. Quanto maior a diferença no índice de refração entre duas regiões, maior será a intensidade de luz refletida. Quanto mais edemaciado estiver o tecido, maior a intensidade de luz difundida. Uma parte da luz refletida e da luz retro-difundida é capturada pela lente objetiva do microscópio especular, que forma no plano de imagem do microscópio uma imagem da região da córnea na qual o instrumento está focalizado.

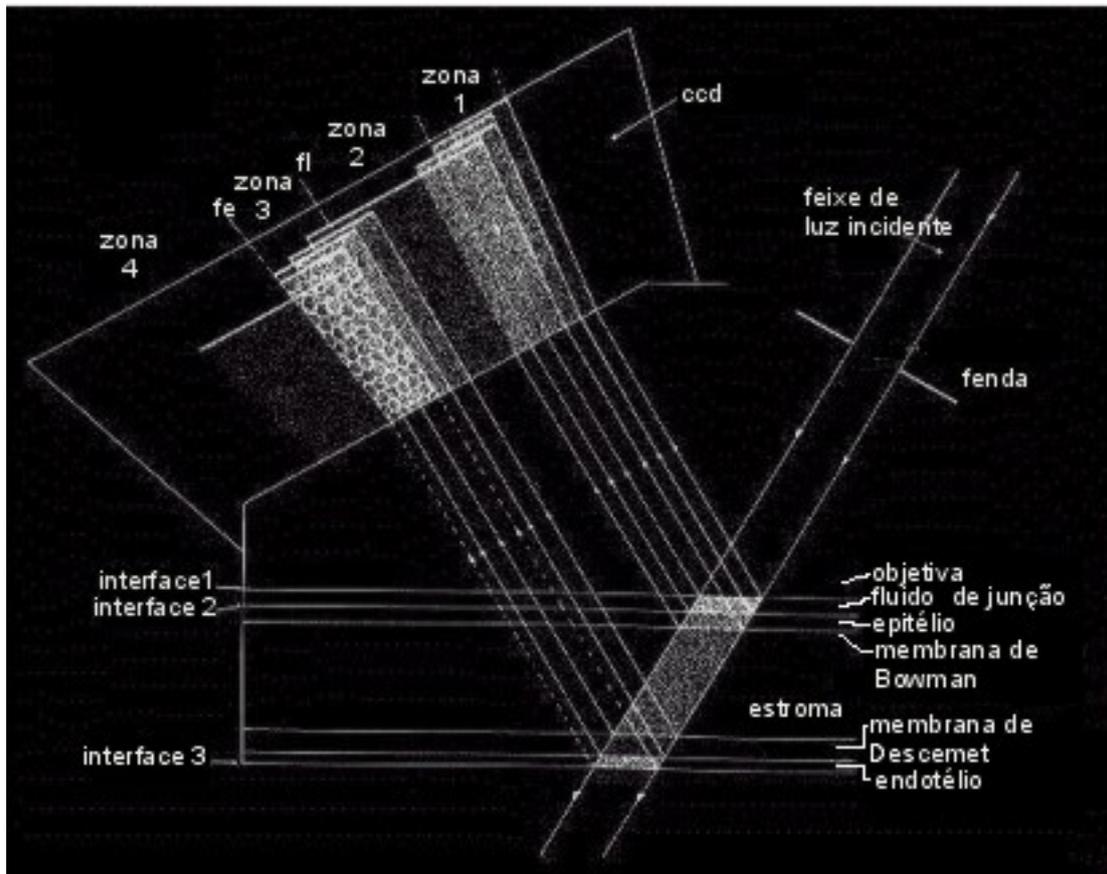


Figura 12: Representação de uma seção óptica quando uma fenda de luz passa pelas várias camadas da córneas e é focalizado na sua superfície posterior. <sup>(18)</sup>

A Figura 12 é a representação de uma seção óptica quando uma fenda de luz estreita (A) ou uma fenda de luz larga (B) passa por várias camadas da córnea e é focalizada na superfície posterior da córnea. Como esboçado, o plano do sensor está posicionado perpendicularmente ao plano do papel. As zonas são definidas na Figura como: fl: fronteira luminosa; fe: fronteira escura.

A luz incidente ilumina, o filme lacrimal pré-corneano ou um meio de junção entre a lente objetiva e a córnea (como por exemplo lágrimas artificiais, metil celulose, etc), o epitélio, a membrana de *Bowman*, o estroma, a membrana de *Descemet*, o endotélio e o humor aquoso. Dentro de cada uma destas regiões, na ausência de edema corneano, só uma pequena quantidade de luz é difundida para o plano imagem, enquanto que as interfaces ópticas principais (rotuladas como 1, 2 e 3) refletirão especularmente uma quantidade maior luz para o plano imagem.

Usando como índices refração para a lente objetiva, solução salina, córnea, e humor aquoso, os respectivos valores 1.517, 1,333, 1,376, e 1.336,

pode-se calcular a fração de luz que é refletida de cada uma destas interfaces. Assim, temos que 0,36% é refletido entre a interface da lente objetiva e a solução salina; 0.025% da interface entre a solução salina e o epitélio corneano e; 0.022% entre a interface do endotélio corneano e o humor aquoso. As interfaces ópticas intra-corneanas (como por exemplo, entre o epitélio e a membrana de *Bowman*, ou entre o estroma e a membrana de *Descemet*, etc) também refletem luz, mas a fração de luz refletida não pode ser calculada, porque os índices de refração destas camadas da córnea nunca foram medidos.

No plano imagem do microscópio especular, a luz proveniente das várias regiões e interfaces da córnea se sobrepõem. Sempre que uma região luminosa e uma região escura se sobrepõe, a região escura não será observada, obviamente. Se uma fenda de luz incidente, suficientemente estreita, é usada, o observador geralmente poderá distinguir uma região luminosa (Zona 1), parte da região estromal (Zona 2), a região endotelial (Zona 3), e parte do humor aquoso (Zona 4). A zona 1 é formada pela luz refletida da interface entre a lente objetiva e o fluido de junção ou, pela interface entre o fluido de junção e o epitélio ou, ambos, dependendo do índice de refração do fluido de junção usado.

A linha de demarcação entre as Zonas 3 e 4, que separa a córnea iluminada das estruturas não iluminadas localizada mais posteriormente, é chamado de fronteira escura (vide Figura 12). Um lado da fronteira é escuro, pois uma parte da luz desprezível é difundida no humor aquoso. Em contraste, a linha de demarcação entre as Zonas 2 e 3 é chamada de fronteira luminosa. Esta fronteira separa a reflexão endotelial da sobreposição da iluminação do estroma corneano. Considerando que, uma parte da luz é difundida no estroma, nenhum lado desta fronteira é escuro.

É de importância clínica a largura da fenda de luz projetada sobre a córnea pelo microscópio especular. Se o ângulo de incidência da fonte luminosa é aumentado, uma fenda mais larga pode ser utilizada e um campo maior de células endoteliais pode ser visto. Porém, o aumento no brilho da fenda também iluminará mais o tecido corneano anterior ao endotélio, de forma que a interferência estromal aumentará, e mais luz será difundida para o plano de imagem do microscópio especular. Isto resultará em uma diminuição do

contraste da imagem endotelial e uma perda da definição celular. O uso de uma fenda larga dá um campo maior de células, embora isto seja feito às custas de uma imagem de baixa qualidade. Esta opção de troca entre o contraste da fotografia e o número de células dentro de um único quadro de imagem não é devido a uma limitação óptica do instrumento, mas sim devido ao espalhamento de luz que se sobrepõe à camada endotelial. Para ângulos grandes de incidência, células endoteliais normais aparecem encurtadas, resultando num padrão de célula endotelial distorcida, e isto deveria ser compensado em análises morfométricas. Em microscópios de varredura por fenda ou por microscópios de varredura confocal, a largura da fenda (ou diâmetro do orifício) feita é muito pequena, pelo menos teoricamente, e um aumento da qualidade de imagem e o campo grande desejado são realizados movendo a fenda de luz (ou spot) sobre o endotélio, nervos estromais, etc.

Usando uma fenda estreita, quatro zonas distintas podem ser observadas; com uma fenda larga, somente três zonas são aparentes. Uma zona luminosa, zona 1, surge da reflexão na interface entre a lente objetiva e o epitélio. Da zona 2 surge uma luz difusa proveniente do estroma corneano, e somente pode ser observada em sensores ou fotografias quando utilizado uma fenda estreita. Esta zona é mais escura em córneas transparentes e mais luminosa em córneas edemaceadas. A zona 3 mostra a camada de células endoteliais observada pela reflexão especular da luz, na superfície posterior da córnea, enquanto que a zona 4, a zona escura, é observada pela luz difundida no humor aquoso. Considerando que uma pequena quantidade de luz normalmente é difundida no humor aquoso, então, nenhuma luz vinda desta região voltará o microscópio, e portanto, a zona 4 geralmente é escura.

### 2.3.3 - AVALIAÇÃO DE CÓRNEAS DOADAS

A microscopia especular da córnea em Banco de Olhos é extremamente importante para a avaliação da densidade de células endoteliais da córnea (células/mm<sup>2</sup>), da homogeneidade dos tamanhos, do formato celular e do aspecto dos limites celulares que nos dá uma avaliação indireta da vitalidade do endotélio corneano.

Os critérios utilizados pelo Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para a recusa de córneas doadas são os seguintes:

No endotélio:

1. Densidade de células endoteliais menor que 2000 células/mm<sup>2</sup>.
2. Polimegatismo severo.
3. Pleomorfismo severo.

No epitélio:

4. Ressecamento e erosão de epitélio.
5. Pterígio e grau de avanço sobre a córnea (em mm).
6. Arco senil em extensão (em mm).
7. Corpos estranhos depositados no epitélio.
8. Transparência.

No estroma:

9. Transparência.
10. Cicatrizes estromais por trauma.
11. Cicatrizes estromais por agentes infecciosos.

Dos critérios listados acima o mais objetivo é o da determinação do número de células endoteliais que existem por mm<sup>2</sup>, uma vez que a célula endotelial é a responsável pela transparência da córnea. Sabe-se que os seres humanos apresentam uma perda natural de células endoteliais desde o seu nascimento até a sua morte, sendo as fases: do nascimento até o final da adolescência, e a partir dos 60 anos, as fases em que se mais perdem células endoteliais.

Além da perda natural de células endoteliais, existem outros fatores que podem acelerar este processo, são eles:

1. Extração extracapsular da catarata com implante de lente intra-ocular
2. Transplante de córnea
3. Rejeições
4. Uveítes
5. Glaucoma
6. Traumas

Uma avaliação incorreta do aspecto da camada de células endoteliais da córnea pode levar à perda da córnea e até mesmo a perda de visão do paciente, por isso, o Banco de Olhos de Ribeirão Preto classifica como ideal, córneas com uma densidade celular acima de 2500 células/mm<sup>2</sup>.

### **3 - SISTEMA ÓPTICO - MICROSCÓPIO ESPECULAR**

(6,11, 12, 18, 25)

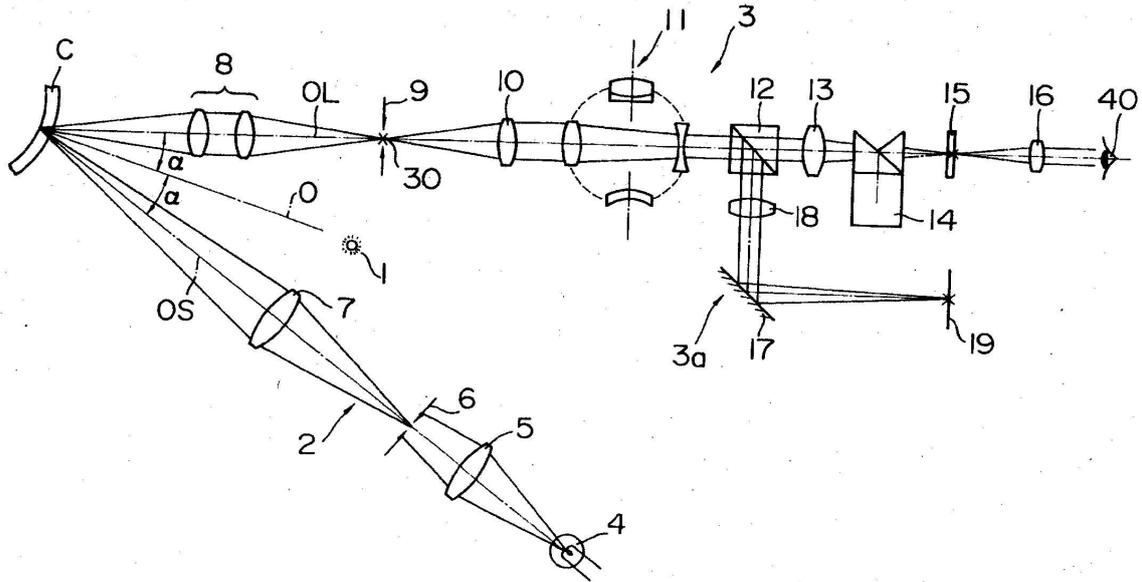
Atualmente no mercado existem dois tipos de aparato óptico que realiza a microscopia especular da córnea: os microscópios especulares de contato e os de não contato.

No *Microscópio especular de contato* faz-se necessário o contato físico entre sua objetiva e a córnea do paciente examinado, permitindo um maior controle por parte do examinador sobre a região da córnea que se deseja examinar, porém não é possível a realização de exames em córneas doadas, uma vez que estas são armazenadas em recipiente de vidro ou acrílico contendo líquido preservativo.

*Microscópio Especular de Não-Contato* não é necessário o contato físico entre a objetiva do microscópio e a córnea do paciente e também é permitido o exame de córneas doadas, porém este tipo de microscópio permite apenas um exame da região central da córnea, que para os Banco de Olhos não apresenta nenhum problema já que é justamente essa a região de interesse ao se examinar uma córnea doada e indicá-la ao transplante. Vale a pena mencionar, que apenas o chamado “botão central” (região de 3mm de diâmetro) é que irá ser utilizado no transplante.

Como o objetivo deste trabalho é desenvolver um microscópio especular para banco de olhos, será detalhado apenas o sistema ótico do microscópio especular de não-contato existente no mercado.

Os microscópios especulares de não-contato existentes subdividem-se em duas categorias: o utilizado na clínica médica, que permite o exame da camada endotelial tanto em córneas *in vivo* quanto em córneas *in vitro*; e o específico para Banco de Olhos, que somente realizam os exames da camada endotelial em córneas *in vitro*. A Figura 13 ilustra o diagrama esquemático de um microscópio especular de não-contato utilizado pela clínica médica e a Figura 14, o diagrama esquemático de um microscópio especular de não-contato específico para Banco de Olhos.



**Figura 13: Diagrama esquemático de um microscópio especular de não – contato utilizado em clínica médica, US Patent 4597650 <sup>(25)</sup>.**

A Figura 13 mostra o sistema óptico do microscópio especular de não contato utilizado na clínica médica, que está subdividido em três partes. A primeira parte (1) é um “ponto alvo”, ou seja, uma pequena lâmpada para que o paciente possa fixar o olhar durante o exame. Quando o paciente fixa o olho neste ponto alvo pode-se imaginar um eixo que passa pelo seu centro e pelo centro da córnea, denominado “O”; a parte 2 é o sistema de iluminação do microscópio especular, no qual todos seus componentes ópticos estão alinhados em um eixo “OS”; e na parte 3 tem-se o sistema óptico de observação e captura da imagem no qual todos seus componentes ópticos estão alinhados em um eixo, denominado “OL”.

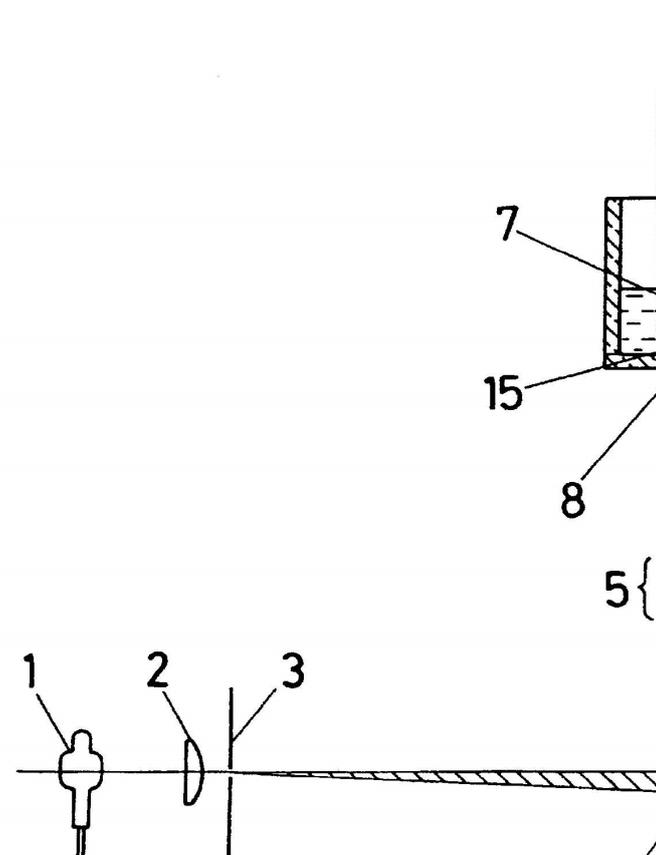
O sistema de iluminação (2) é constituído por uma lâmpada (4), uma lente condensadora (5), um anteparo com uma abertura variável em forma de fenda retangular em seu centro (6) e uma lente de projeção (7). O filamento da lâmpada está localizado no ponto focal da lente condensadora, para que seja aproveitada a maior quantidade possível de luz. Posterior a lente condensadora tem-se o anteparo que é iluminado por uma frente de onda plana, que produz no lado oposto do anteparo uma nova fonte de luz, mas agora em forma de uma fenda retangular iluminada. A lente de projeção projeta a imagem desta fenda na superfície da camada endotelial da córnea (C).

O sistema óptico de observação e captura da imagem (3) é constituído por uma lente objetiva (8), um anteparo com abertura variável (9), uma lente retransmissora (10), um sistema com poder de magnificação variado (11), um divisor de feixes (12), uma lente formadora de imagem (13), um prisma inversor (14), um plano focal (15) e uma lente ocular (16). O feixe de luz que passa pelo divisor de feixes (12) chega ao CCD (19) que captura a imagem e a disponibiliza em um monitor de vídeo. A imagem da fenda retangular que está projetada na córnea, está também localizada no ponto focal paraxial da primeira lente da objetiva, isto permite que se aproveite o máximo de luminosidade do objeto. A segunda lente da objetiva projeta a imagem sobre um anteparo que controla a quantidade luz que passa pelo sistema. A imagem que se forma sobre o anteparo está no ponto focal paraxial da lente retransmissora, permitindo que um telescópio galileano magnifique a imagem.

O sistema de magnificação deste microscópio é variável. Ele é composto por dois telescópios *Galileanos*, que oferece quatro tipos de magnificações diferentes. O telescópio Galileano possibilita a compactação do sistema, evita aberrações e tem um melhor aproveitamento da luminosidade que passa pelo sistema.

O feixe de luz paralela que sai do telescópio Galileano passa por um divisor de feixe, onde uma parte do feixe segue seu caminho natural e através de uma lente formadora de imagem, um prisma inversor e uma ocular pode-se visualizar a imagem. A outra parte do feixe é desviada e, com o auxílio de uma lente para se formar a imagem e de um CCD, pode-se visualizar a imagem em um monitor de vídeo.

O eixo óptico OS do sistema de iluminação (2) e o eixo óptico (OL) do sistema de observação estão dispostos de tal forma a fazerem o mesmo ângulo com o eixo óptico (O) do olho do paciente.



**Figura 14: Diagrama esquemático de um microscópio especular de não – contato específico para Banco de Olhos, US Patent 5956123 (6).**

A Figura 14 ilustra o sistema óptico do microscópio especular de não-contato específico para Banco de Olhos. Em (1) tem-se uma lâmpada incandescente, em (2) uma lente condensadora, em (3) um anteparo com uma abertura fixa em forma de fenda, em (4) um espelho e, em (5) a objetiva do microscópio especular. Note que o conjunto formado pela metade (esquerda) da objetiva juntamente com o espelho fazem o papel da lente de projeção do sistema de iluminação da Figura 13. A fenda é projetada sobre a superfície endotelial (8) da córnea através da metade esquerda da lente objetiva, enquanto que a metade direita fica disponível para visualizar a imagem iluminada, esta imagem é magnificada e focalizada sobre um CCD (6), que a disponibiliza em um monitor de vídeo.

Os dois microscópios especulares mencionados cumprem muito bem seus objetivos, porém, o microscópio apresentado na Figura 13, além de

possuir magnificação variada, ele também tem a vantagem de poder ser usado tanto na clínica médica quanto em Banco de Olhos.

Previamente a apresentação do sistema desenvolvido nesta dissertação, que será descrita no capítulo 4, vale a pena remeter-se ao Apêndice II, para uma leitura sobre noções de avaliações óticas, para facilitar o entendimento do desenvolvimento da ótica de nosso sistema, que foi projetado utilizando-se um *software* comercial ZEMAX-XE da *ZEMAX Development Corporation*.

## **4 - SISTEMA DESENVOLVIDO**

O trabalho como um todo, teve como objetivo projetar e montar um Microscópio Especular para Banco de Olhos com múltiplas magnificações, sem perder qualidade de imagem. Um *software* dedicado<sup>(2)</sup>, desenvolvido no nosso grupo, foi incorporado. Ele realiza o reconhecimento e a contagem das células endoteliais da córnea para a realização das análises necessárias, que possibilitarão a indicação da córnea para o transplante.

Os Materiais utilizados para a elaboração deste projeto foram:

- *Software* Comercial de desenho óptico: *ZEMAX Optical Design Program* da *ZEMAX Development Corporation*.
- Microcomputador (PC) Pentium I, 166MHZ, 16MB de RAM
- Câmera CCD WATEC-902-HS de 1/2", que possui uma sensibilidade de 0,00015lux, resolução de 570 linhas de TV, 380K pixels e relação sinal/ruído maior do que 50dB
- Placa de captura de vídeo Meteor I da Matrox.
- Lentes de diversos poderes dióptricos
- Suportes para lente
- Diafragmas
- Laser Vermelho para alinhamento ótico
- Lâmpadas diversas
- Bancada Ótica de Granito
- Microscópio Especular Konan EKA-98, para comparações de medidas
- Córneas

Em trabalhos anteriores<sup>(1,2)</sup>, foi desenvolvido por mim e pela equipe do Laboratório de Física Oftálmica, uma ótica para Lâmpada de Fenda, onde objetivo era torná-la um microscópio especular "in vitro". Uma das lentes de magnificação do sistema desenvolvida naquele sistema, foi premiada<sup>(33 - 34)</sup>. Tal experimento serviu para direcionar o desenvolvimento do atual sistema.

A metodologia do desenvolvimento deste equipamento fica subdividida em 3 partes: sistema óptico (projeto e montagem), sistema de captura de imagem (disponibilização da imagem em um monitor de vídeo) e sistema computacional (*software* de determinação da densidade celular e dos índices de pleomorfismo e polimegatismo).

#### 4.1 PROJETO ÓPTICO

O **sistema óptico** é dividido em duas partes:

1. Sistema de Iluminação que projeta um feixe de luz em forma de fenda sobre a córnea a ser avaliada.
2. Sistema de magnificação que amplia a região da córnea iluminada pelo sistema de iluminação e disponibiliza esta imagem ampliada para o sistema de Captura de Imagem.

Todo o sistema óptico foi projetado com a ajuda do software dedicado de desenho óptico *ZEMAX Optical Design Program*. Foram realizados 6 (seis) projetos ópticos, sendo 1 para o sistema de iluminação e 5 para o sistema de magnificação, (um projeto para cada magnificação diferente do microscópio especular, onde as magnificações são: 20x, 30x, 63x, 136x e 205x).

A Figura 15 ilustra o diagrama de blocos do sistema projetado como um todo. Em (1) tem-se a fonte de luz do sistema de iluminação, que consiste de uma lâmpada incandescente, em (2) tem-se a lente que condensa o feixe de luz e o projeta sobre a superfície do diafragma; em (3) tem-se o diafragma em forma de fenda, com regulagem de largura de abertura, e o diafragma circular com regulagem do diâmetro de abertura; em (4) tem-se a lente de projeção onde, sua função é projetar sobre a superfície da córnea uma fenda retangular de luz; (5) é a córnea observada; em (6) tem-se a objetiva do microscópio especular (M.E.); O plano de imagem da fenda de luz, que é projetado na córnea coincide com o plano focal da objetiva do M.E.; em (7) tem-se o sistema de multi-magnificação do M.E., onde este sistema é composto por dois telescópio Galileanos; (8) é um diafragma com abertura circular variável que controla a quantidade de luz que entra no sistema; em (9) tem-se o sistema de magnificação definitivo do M.E., que também pode ser chamada de “ocular”, e; em (10) tem-se o sensor C.C.D. que, com a ajuda de uma placa de captura de vídeo, permite visualizar a imagem em um monitor de computador.

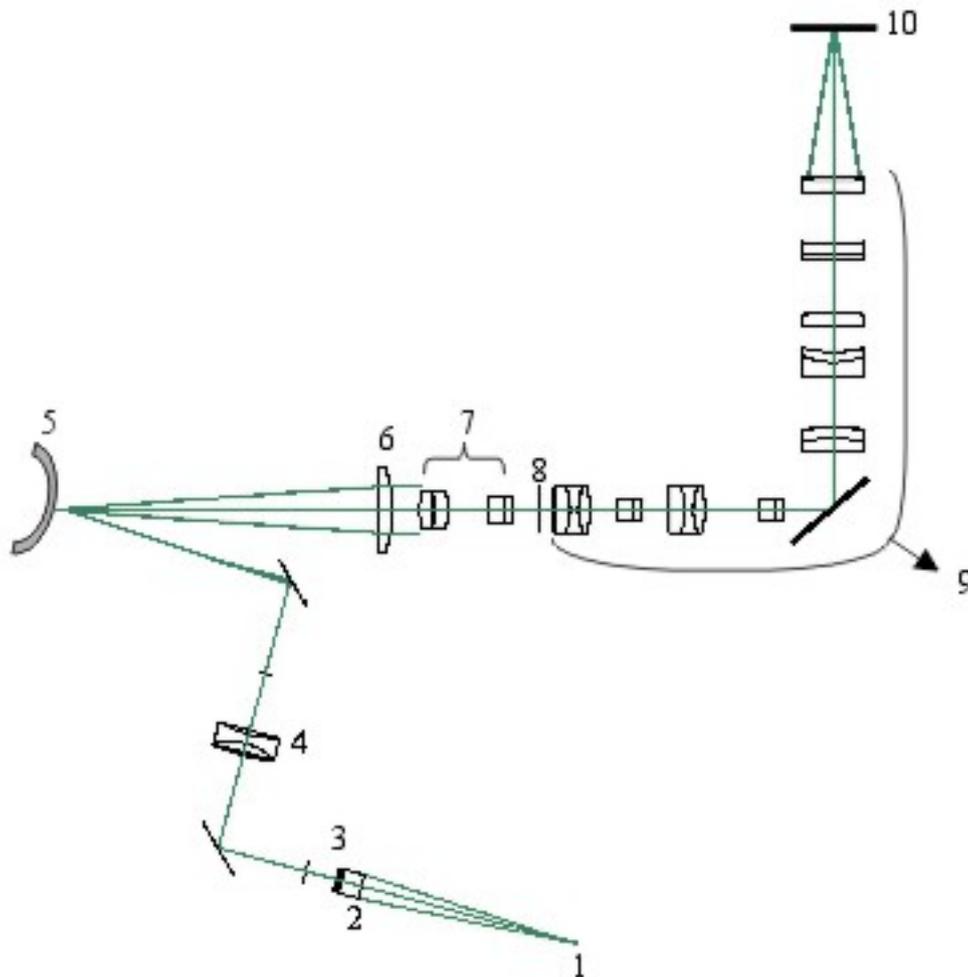


Figura 15: Diagrama esquemático do microscópio especular projetado.

A seguir serão apresentados os 6 (seis) projetos ópticos para o microscópio especular, um para o sistema de iluminação e um para cada sistema de magnificação diferente (05 magnificações).

Cada projeto óptico é formado por:

- Descrição de dados
- Desenho esquemático do sistema óptico

Para projetar um sistema óptico no *ZEMAX Optical Design Program* o usuário deve entrar com os principais parâmetros para a projeção do sistema, Figura I.10, (Apêndice I), que ilustra a tabela apresentada para o usuário do *software*. São eles:

- Raio de curvatura de cada superfície da lente;
- Espessura da lente;
- Diâmetro das lentes;

- Distância entre as lentes;
- Distância entre o plano do objeto e a 1ª superfície do sistema.
- Tamanho do objeto.
- Superfície de *Stop*
- Índice de refração do material a compor a lente;
- Diâmetro da pupila de entrada do sistema;
- Onda primária: comprimento de onda principal que o sistema estará trabalhando;

#### 4.1.1 - SISTEMA DE ILUMINAÇÃO

Como já comentado, o sistema foi projetado em partes. A primeira delas, foi o sistema de iluminação da córnea, em forma de fenda e em ângulo, cujo ângulo ideal de iluminação foi de 60°.

A tabela 1 traz os dados gerais do projeto sistema de iluminação, que é composto por: 01 lâmpada, 01 lente condensadora, 01 lente de projeção, 01 diafragma, 01 fenda retangular com largura variável e 01 fenda circular com diâmetro variável.

**Tabela 1: Dados gerais do sistema de iluminação.**

Número de Superfícies	16
Superfície de Stop	1
Abertura do Sistema	10
Catalago de Vidros	Schott, schottv, schott 2000
Comprimento Focal Efetivo	41.147
Comprimento Focal Posterior	-27.62242
Magnificação Paraxial	-4.704349
Diâmetro da pupila de entrada	10
Onda Primária	0.5875618 microns
Unidade de Medida	Milímetros
Magnificação Angular	1.97471

A tabela 2 traz os dados das superfícies de cada lente do sistema de iluminação inseridos através do editor de dados de lentes do *software*.

**Tabela 2: Dados das superfícies de cada lente do sistema de iluminação.**

Superfície	Tipo	Comentários	Raio	Espessura	Vidro	Diâmetro
OBJ	STANDARD		Infinity	90		1.110728
STO	STANDARD		60	8.603477	BK7	10.0259
2	STANDARD		--60	1		10.21957
3	STANDARD	DIAF CIRC VARIAB	Infinity	1		10.15534
4	STANDARD	DIAF RETA VARIAB	Infinity	13		10.10261
5	STANDARD		Infinity	37		9.41712
6	COORDBRK			0	-	0
7	STANDARD		Infinity	0	MIRROR	25
8	COORDBRK			-39.3	-	0
9	STANDARD		-85	-5	Bk7	25.64017
10	STANDARD		25	-4	F2	25.51495
11	STANDARD		-50	-25.64358		25.47408
12	STANDARD		Infinity	-40		4.901665
13	COORDBRK			0	-	0
14	STANDARD		Infinity	0	MIRROR	25
15	COORDBRK			90	-	0
IMA	STANDARD		Infinity			5.296677

A tabela 3 traz os pontos cardinais (pontos principais do eixo de um sistema óptico) do sistema de iluminação. Estes pontos são calculados pelo *software*. Na tabela 3 a posição do objeto é medida em relação a superfície 1e a posição da Imagem é medida com relação a superfície da imagem

**Tabela 3: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de iluminação.**

	Objeto (mm)	Imagem (mm)
Ponto focal	-41.147004	41.147004
Plano Focal	-81.253412	-183.266002
Plano Principal	-40.106408	-224.413006
Plano Anti-Principal	-122.400416	-142.118998
Plano Nodal	-40.106408	-224.413006
Plano Anti-Nodal	-122.400416	-142.118998

Para um maior detalhamento das superfícies do sistema de iluminação vide apêndice 2, tabela II-1.

A seguir são apresentados os desenhos de cada lente que compõe o sistema de iluminação, Figuras 16 e 17, e o desenho do projeto óptico do sistema de iluminação desenvolvido, Figura 18.

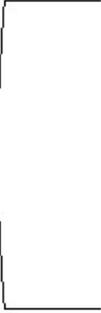
A Figura 16 é o projeto da lente condensadora do sistema de iluminação do microscópio especular desenvolvido, e ilustra a tela apresentada no *software* de desenho ótico ZEMAX-XE.

A Figura 17 é o projeto da lente de projeção do sistema de iluminação do microscópio especular desenvolvido e ilustra a tela apresentada no *software* de desenho ótico ZEMAX-XE .

RADIUS	RAD TOL	IRR TOL	C.A. DIA	EDGE DIA	MATERIAL
60.0000 CX	0.0000	0.0	10.0259	10.2196	BK7
-60.0000 CX	0.0000	0.0	10.2196		

1. ALL DIMENSIONS IN MILLIMETERS
2. MATERIAL PER MIL-G-174
3. PITCH POLISH TO TEST PLATE WITHIN POWER AND IRREGULARITY INDICATED.
4. MANUFACTURE PER MIL-O-13B30
5. BEVEL EDGES AT 45 DEG TO 1 MM MAX FACE WIDTH



**Figura 16: Desenho esquemático da lente condensadora do Sistema de Iluminação do M.E**

RADIUS	RAD TOL	IRR TOL	C.A. DIA	EDGE DIA	MATERIAL
-50.0000 CC	0.0000	0.0	10.1553	25.5149	F2
25.0000	0.0000	0.0	10.2196	25.6402	BK7
-85.0000 CX	0.0000	0.0	10.0259		

1. ALL DIMENSIONS IN MILLIMETERS  
 2. MATERIAL PER MIL-G-174  
 3. PITCH POLISH TO TEST PLATE WITHIN POWER AND IRREGULARITY INDICATED.  
 4. MANUFACTURE PER MIL-O-13830  
 5. BEVEL EDGES AT 45 DEG TO 1 MM MAX FACE WIDTH



Figura 17: Desenho esquemático da lente de projeção do Sistema de Iluminação do M.E.

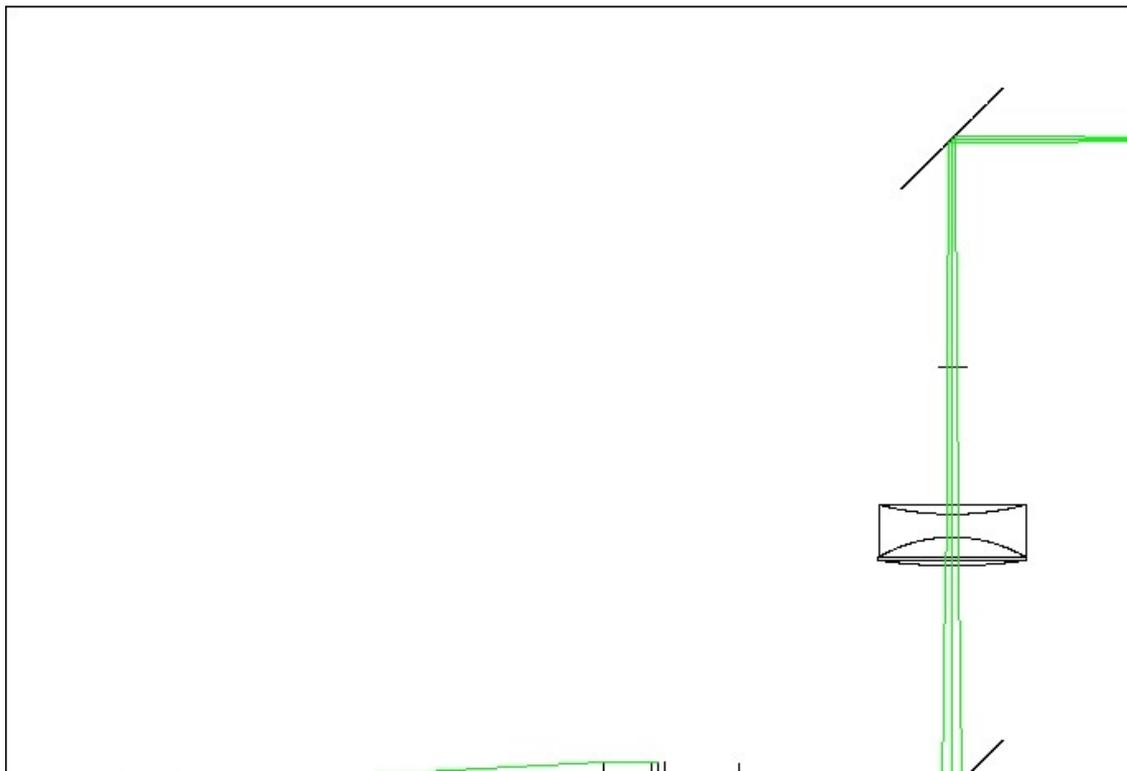


Figura 18: Desenho esquemático do Sistema de Iluminação do M.E.

#### 4.1.2 – MICROSCÓPIO ESPECULAR DESENVOLVIDO

##### 4.1.2.1 – MAGNIFICAÇÃO DE 20X

Para a magnificação de 20x da imagem obtida pelo sistema de iluminação e refletida especularmente pela córnea, foi projetado o sistema ótico composto por 1 lente objetiva, 1 telescópio galileano formado por 2 dubletos (lente composta por dois índices de refração diferentes e 3 raios de curvatura), 1 diafragma, 1 telescópio de lentes eretoras formado por 1 lente, 6 dubletos, 1 tripleto (lente composta por três índices de refração e 4 raios de curvatura), e 1 prisma.

Os dados inseridos no *software* do ZEMAX-XE estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4: Dados gerais do sistema de magnificação de 20x.**

Número de Superfícies	41
Superfície de Stop	1
Abertura do Sistema	15
Catalago de Vidros	Schott, schottv, schott 2000
Comprimento Focal Efetivo	11.88341
Comprimento Focal Posterior	373.8807
Magnificação Paraxial	-19.860510
Diâmetro da pupila de entrada	15
Onda Primária	0.5875618 mícron
Unidade de Medida	Milímetros
Magnificação Angular	-9.743827

**Tabela 5: Dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 20x.**

Superfície	Tipo	Comentário	Raio	Espessura	Vidro	Diâmetro
OBJ	STANDARD		Infinity	116.3882		0.0004062715
STO	STANDARD		Infinity	5	BK7	37
2	STANDARD		-62.22269	30		37
3	STANDARD		-60.2	3	BASF2	9
4	STANDARD		81.343	6	FK3	9
5	STANDARD		160	126.8805		9
6	STANDARD		120	5	LAF22A	15
7	STANDARD		75	5	FK5	15
8	STANDARD		-186.7249	30		15
9	STANDARD	DIAFRAGMA	Infinity	5		20
10	STANDARD		Infinity	6	K10	20

11	STANDARD		-27.98414	3	F1	20
12	STANDARD		34.38204	4	F6	20
13	STANDARD		-66.82272	118.7771		20
14	STANDARD		-160	6	FK3	9
15	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
16	STANDARD		60.2	10		9
17	STANDARD		Infinity	6	K10	20
18	STANDARD		-27.98414	3	F1	20
19	STANDARD		34.38204	4	F6	20
20	STANDARD		-66.82271	118.7771		20
21	STANDARD		-160	6	FK3	9
22	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
23	STANDARD		60.2	20		9
24	COORDBRK			0	-	0
25	STANDARD		Infinity	0	MIRROR	20
26	COORDBRK			-20	-	0
27	STANDARD		-130	-5	FK3	20
28	STANDARD		38.12157	-4	F6	20
29	STANDARD		83.47474	-59.05749		20
30	STANDARD		150	-5	FK3	20
31	STANDARD		-20.30485	-4	F6	20
32	STANDARD		-36.3726	-10		20
33	STANDARD		Infinity	-5	BK7	20
34	STANDARD		62.22269	-27		20
35	STANDARD		-120	-2	K10	20
36	STANDARD		-110	-4	LAF22A	20
37	STANDARD		-60	110		20
38	STANDARD		60	-4	LAF22A	20
39	STANDARD		110	-2	K10	20
40	STANDARD		120	-137.8702		20
IMA	STANDARD		Infinity			171.1484

A tabela 6 traz os pontos cardinais do sistema de ampliação de 20x. Os pontos cardinais referente à posição do objeto é medida em relação à superfície 1 e a posição da Imagem é medida com relação a superfície da imagem.

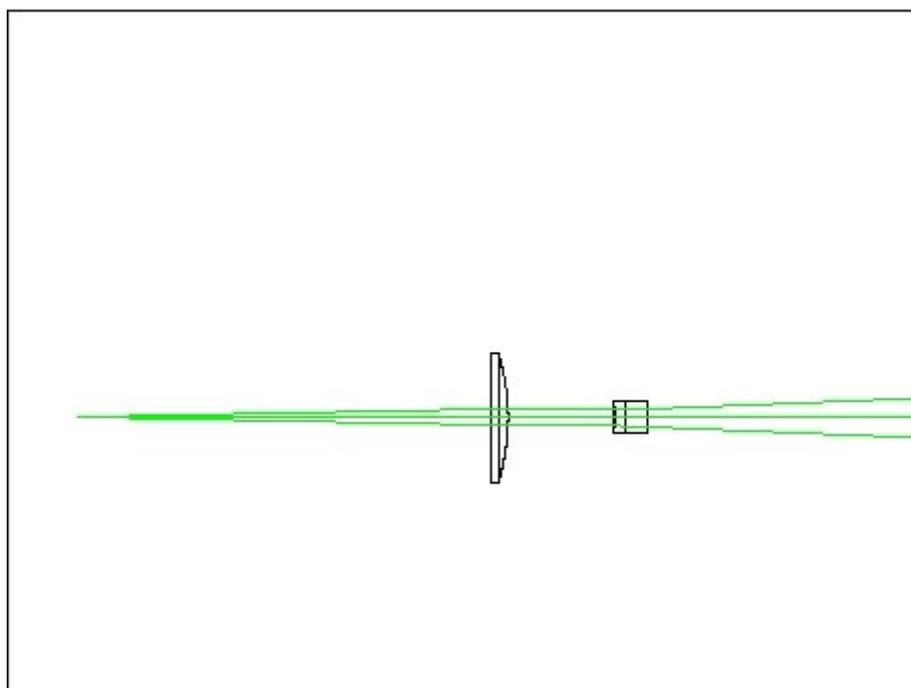
**Tabela 6: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de magnificação 20x.**

	Objeto (mm)	Imagem (mm)
Ponto Focal	-11.883409	-11.883409
Plano Focal	-115.789876	236.010565
Plano Principal	-103.906468	247.893974
Pano Anti-Principal	-127.673285	224.127156
Plano Nodal	-127.673285	224.127156
Plano Anti-Nodal	-103.906468	247.893974

Para um maior detalhamento das superfícies do sistema de magnificação de 20x vide apêndice 2, tabela II-2.

A seguir são apresentados os desenhos do sistema objetiva/telescópio galileano (Figura 19), do sistema responsável pela magnificação definitiva do microscópio especular (Figura 20) e o desenho do projeto óptico do sistema de magnificação de 20x, Figura 21.

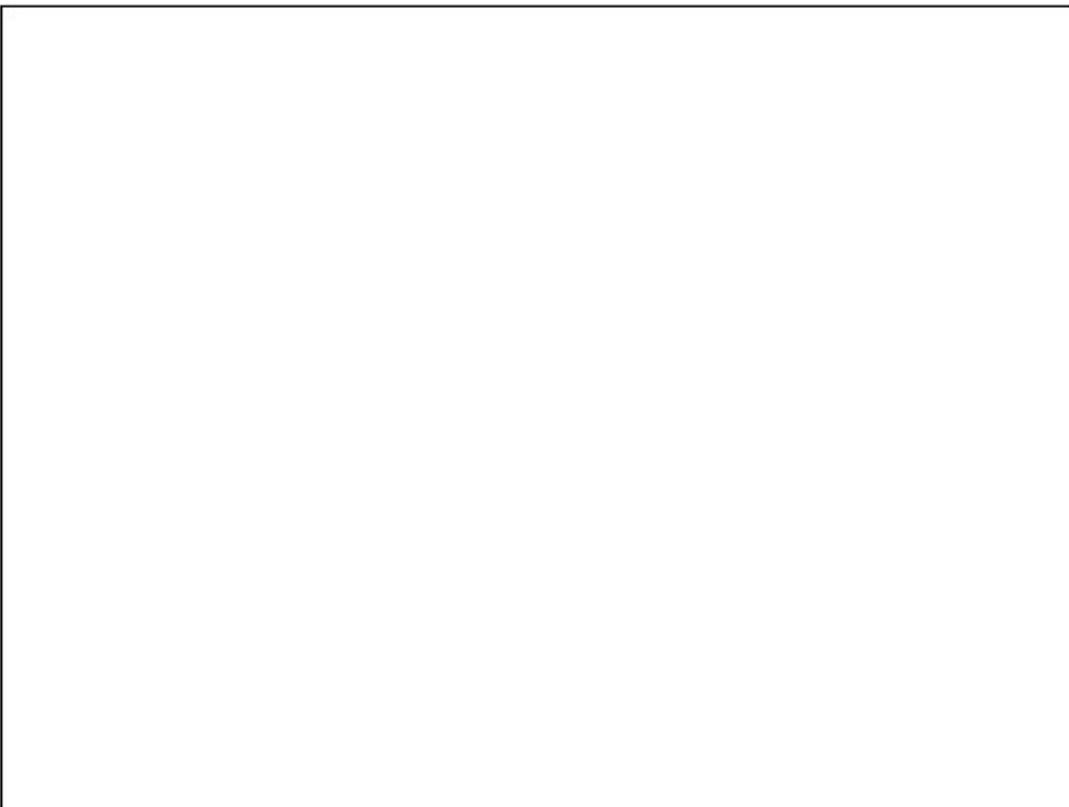
O sistema óptico apresentado na Figura 20 é o mesmo para todos os sistemas de magnificação do microscópio especular e possui um poder de magnificação de  $-63.0x$ . O que varia de um sistema para outro é o poder de magnificação do sistema objetiva/telescópio galileano que para o sistema com aumento de 20x possui um poder de magnificação de  $-0.31x$ .



**Figura 19: Sistema objetiva/telescópio galileano do Microscópio Especular para magnificação de 20x.**



**Figura 20: Sistema Óptico para aumento definitivo do Microscópio Especular.**



**Figura 21: Sistema Óptico completo para o Microscópio Especular com magnificação de 20x.**

#### 4.1.2.2 – MAGNIFICAÇÃO DE 30X

Para a magnificação de 30x da imagem obtida pela reflexão especular, na córnea, da luz vinda do sistema iluminação, foi projetado o sistema ótico composto por 1 lente objetiva, 1 telescópio galileano formado por 2 dubletos, 1 diafragma, 1 telescópio de lentes eretoras formado por 1 lente, 6 dubletos, 1 triplete, e 1 prisma.

Os dados inseridos no *software* do ZEMAX-XE estão apresentados nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7: Dados gerais do sistema de magnificação de 30x.**

Número de Superfícies	41
Superfície de Stop	1
Abertura do Sistema	20
Catalago de Vidros	Schott, schottv, schott 2000
Comprimento Focal Efetivo	7.942981
Comprimento Focal Posterior	373.9252
Magnificação Paraxial	-29.73294
Diâmetro da pupila de entrada	20
Onda Primária	0.5875618 mícron
Unidade de Medida	Milímetros
Magnificação Angular	-14.6693

**Tabela 8: Dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 30x.**

Superfície	Tipo	Comentário	Raio	Espessura	Vidro	Diametro
OBJ	STANDARD		Infinity	116.7851		0.0004076569
STO	STANDARD		Infinity	5	BK7	37
2	STANDARD		-62.22269	30		37
3	STANDARD		-101.1092	3	BASF2	15
4	STANDARD		110	6	FK3	15
5	STANDARD		180	97.23625		15
6	STANDARD		120	5	LAF22A	12
7	STANDARD		75	5	FK5	12
8	STANDARD		-186.7249	10		12
9	STANDARD	DIAFRAGMA	Infinity	5		20
10	STANDARD		Infinity	6	K10	20

11	STANDARD		-27.98414	3	F1	20
12	STANDARD		34.38204	4	F6	20
13	STANDARD		-66.82272	118.7771		20
14	STANDARD		-160	6	FK3	9
15	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
16	STANDARD		60.2	10		9
17	STANDARD		Infinity	6	K10	20
18	STANDARD		-27.98414	3	F1	20
19	STANDARD		34.38204	4	F6	20
20	STANDARD		-66.82271	118.7771		20
21	STANDARD		-160	6	FK3	9
22	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
23	STANDARD		60.2	20		9
24	COORDBRK			0	-	0
25	STANDARD		Infinity	0	MIRROR	20
26	COORDBRK			-20	-	0
27	STANDARD		-130	-5	FK3	20
28	STANDARD		38.12157	-4	F6	20
29	STANDARD		83.47474	-59.05749		20
30	STANDARD		150	-5	FK3	20
31	STANDARD		-20.30485	-4	F6	20
32	STANDARD		-36.3726	-10		20
33	STANDARD		Infinity	-5	BK7	20
34	STANDARD		62.22269	-27		20
35	STANDARD		-120	-2	K10	20
36	STANDARD		-110	-4	LAF22A	20
37	STANDARD		-60	-110		20
38	STANDARD		60	-4	LAF22A	20
39	STANDARD		110	-2	K10	20
40	STANDARD		120	-137.7571		20
IMA	STANDARD		Infinity			171.1484

A tabela 9 traz os pontos cardinais do sistema de magnificação de 30x.

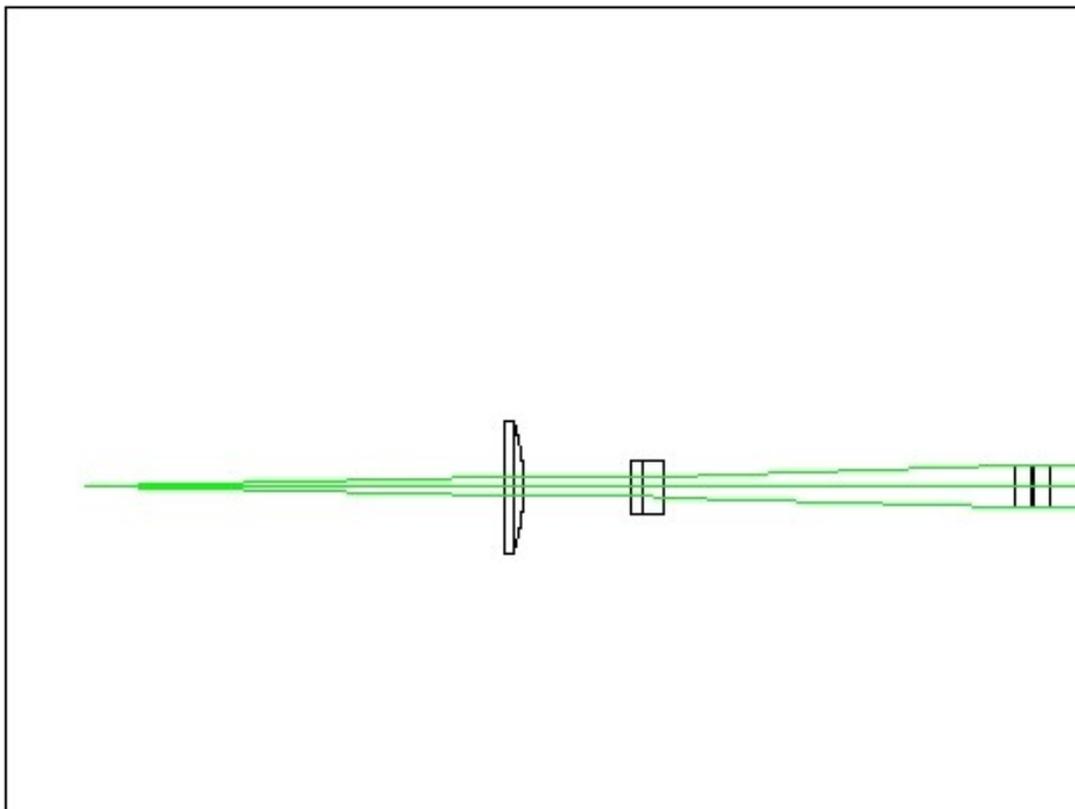
**Tabela 9: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de magnificação de 30x.**

	Objeto (mm)	Imagem (mm)
Ponto Focal	-7.942981	-7.942981
Plano Focal	-116.517956	236.168164

Plano Principal	-108.574975	244.111145
Plano Anti-Principal	-124.460937	228.225183
Plano Nodal	-124.460937	228.225183
Plano Anti-Nodal	-108.574975	244.111145

Para um maior detalhamento das superfícies do sistema de magnificação de 30x vide apêndice 2, tabela II-3.

A seguir são apresentados os desenhos do sistema objetiva/telescópio galileano (Figura 22) que possui um poder de magnificação de  $-0.47x$  e do projeto óptico do sistema de magnificação de 30x, Figura 23.



**Figura 22: Objetiva do Microscópio Especular para magnificação de 30x.**



**Figura 23: Sistema Óptico completo para o Microscópio Especular com magnificação de 30x.**

#### **4.1.2.3 – MAGNIFICAÇÃO DE 63X**

Para a magnificação de 63x da imagem obtida pela reflexão especular, na córnea, da luz proveniente do sistema iluminação, foi projetado o sistema óptico composto por 1 lente objetiva, 1 diafragma, 1 telescópio de lentes eretoras formado por 1 lente, 6 dubletos, 1 triplete, e 1 prisma.

Os dados inseridos no *software* do ZEMAX-XE estão apresentados nas Tabelas 10 e 11.

**Tabela 10: Dados gerais do sistema de magnificação de 63x.**

Número de Superfícies	35
Superfície de Stop	11
Abertura do Sistema	20
Catalago de Vidros	Schott
Comprimento Focal Efetivo	3.724131
Comprimento Focal Posterior	371.1635
Magnificação Paraxial	-63.08986
Diâmetro da pupila de entrada	20

Onda Primária	0.5875618 micron
Unidade de Medida	Milímetros
Magnificação Angular	5.933926

**Tabela 11: Dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 63x.**

Superfície	Tipo	Comentário	Raio	Espessura	Vidro	Diametro
OBJ	STANDARD		Infinity	116.7851		0.0004076569
1	STANDARD		Infinity	5	BK7	37
2	STANDARD		-62.22269	30		37
3	STANDARD	DIAFRAGMA	Infinity	5		20
4	STANDARD		Infinity	6	K10	20
5	STANDARD		-27.98414	3	F1	20
6	STANDARD		34.38204	4	F6	20
7	STANDARD		-66.82272	118.7771		20
8	STANDARD		-160	6	FK3	9
9	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
10	STANDARD		60.2	10		9
STO	STANDARD		Infinity	6	K10	20
12	STANDARD		-27.98414	3	F1	20
13	STANDARD		34.38204	4	F6	20
14	STANDARD		-66.82271	118.7771		20
15	STANDARD		-160	6	FK3	9
16	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
17	STANDARD		60.2	20		9
18	COORDBRK			0	-	0
19	STANDARD		Infinity	0	MIRROR	20
20	COORDBRK			-20	-	0
21	STANDARD		-130	-5	FK3	20
22	STANDARD		38.12157	-4	F6	20
23	STANDARD		83.47474	-59.05749		20
24	STANDARD		150	-5	FK3	20
25	STANDARD		-20.30485	-4	F6	20
26	STANDARD		-36.3726	-10		20
27	STANDARD		Infinity	-5	BK7	20
28	STANDARD		62.22269	-27		20
29	STANDARD		-120	-2	K10	20
30	STANDARD		-110	-4	LAF22A	20
31	STANDARD		-60	-110		20

32	STANDARD		60	-4	LAF22A	20
33	STANDARD		110	-2	K10	20
34	STANDARD		120	-137.7571		20
IMA	STANDARD		Infinity			171.1484

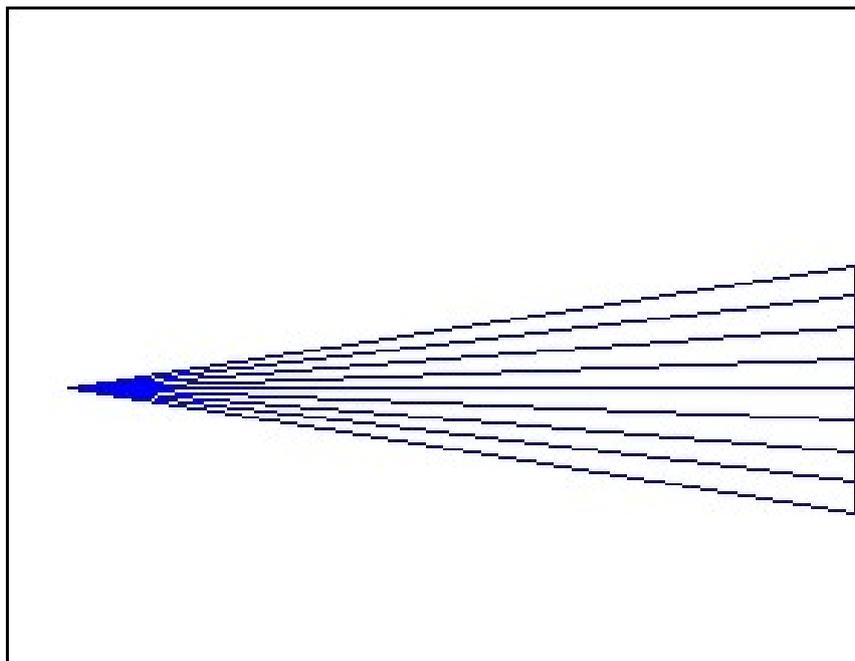
A tabela 12 traz os pontos cardinais do sistema de magnificação de 63x.

**Tabela 12: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de magnificação de 63x.**

	Objeto (mm)	Imagem (mm)
Ponto Focal	-3.724131	-3.724131
Plano Focal	-117.044871	234.954897
Plano Principal	-113.320740	238.679028
Plano Anti-Principal	-120.769002	231.230766
Plano Nodal	-120.769002	231.230766
Plano Anti-Nodal	-113.320740	238.679028

Para um maior detalhamento das superfícies do sistema de magnificação de 63x vide apêndice 2, tabela II-4.

A seguir são apresentados o desenho da objetiva (Figura 24) que possui um poder de magnificação de 1.0x e o desenho do projeto óptico do sistema de magnificação de 63x, Figura 25.



**Figura 24: Objetiva do Microscópio Especular para magnificação de 63x.**

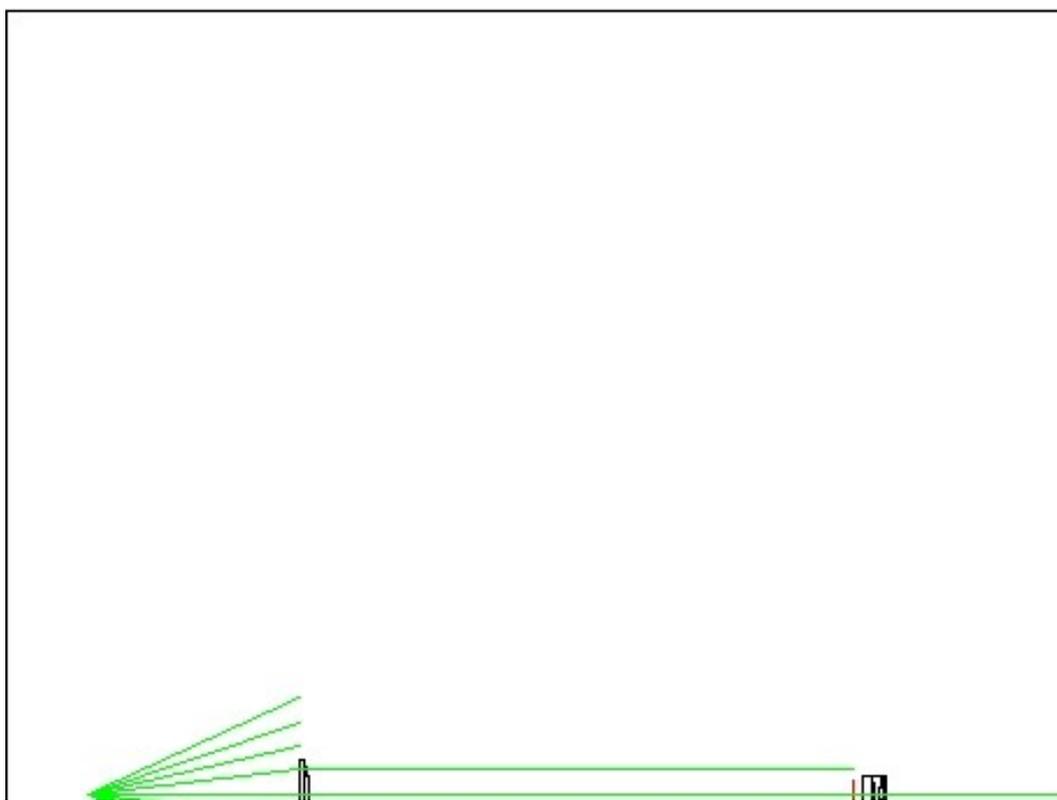


Figura 25: Sistema Óptico completo para o Microscópio Especular com magnificação de 63x.

#### 4.1.2.4 – MAGNIFICAÇÃO DE 136X

Para a magnificação de 136x da imagem obtida pela reflexão especular, na córnea, da luz vinda do sistema iluminação, foi projetado o sistema ótico composto por 1 lente objetiva, 1 telescópio galileano formado por 2 dubletos, 1 diafragma, 1 telescópio de lentes eretoras formado por 1 lente, 6 dubletos, 1 triplete, e 1 prisma.

Os dados inseridos no *software* do ZEMAX-XE estão apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Dados gerais do sistema de magnificação de 136x.

Número de Superfícies	41
Superfície de Stop	1
Abertura do Sistema	20
Catalogo de Vidros	Schott
Comprimento Focal Efetivo	1.740502
Comprimento Focal Posterior	374.798

Magnificação Paraxial	-136.0041
Diâmetro da pupila de entrada	20
Onda Primária	0.5875618 microm
Unidade de Medida	Milímetros
Magnificação Angular	-67.23406

**Tabela 14: Dados das superfícies de cada lente do sistema de ampliação de 136x.**

Superfície	Tipo	Comentário	Raio	Espessura	Vidro	Diâmetro
<b>OBJ</b>	STANDARD		Infinity	117.0338		0.000408525
<b>STO</b>	STANDARD		Infinity	5	BK7	37
<b>2</b>	STANDARD		-62.22269	30		37
<b>3</b>	STANDARD		186.7249	5	FK5	15
<b>4</b>	STANDARD		-75	5	LAF22A	15
<b>5</b>	STANDARD		-120	97.23625		15
<b>6</b>	STANDARD		-180	6	FK3	12
<b>7</b>	STANDARD		-110	3	BASF2	12
<b>8</b>	STANDARD		101.1092	30		12
<b>9</b>	STANDARD	DIAFRAGMA	Infinity	5		20
<b>10</b>	STANDARD		Infinity	6	K10	20
<b>11</b>	STANDARD		-27.98414	3	F1	20
<b>12</b>	STANDARD		34.38204	4	F6	20
<b>13</b>	STANDARD		-66.82272	118.7771		20
<b>14</b>	STANDARD		-160	6	FK3	9
<b>15</b>	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
<b>16</b>	STANDARD		60.2	10		9
<b>17</b>	STANDARD		Infinity	6	K10	20
<b>18</b>	STANDARD		-27.98414	3	F1	20
<b>19</b>	STANDARD		34.38204	4	F6	20
<b>20</b>	STANDARD		-66.82271	118.7771		20
<b>21</b>	STANDARD		-160	6	FK3	9
<b>22</b>	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
<b>23</b>	STANDARD		60.2	20		9
<b>24</b>	COORDBRK			0	-	0
<b>25</b>	STANDARD		Infinity	0	MIRROR	20
<b>26</b>	COORDBRK			-20	-	0
<b>27</b>	STANDARD		-130	-5	FK3	20
<b>28</b>	STANDARD		38.12157	-4	F6	20
<b>29</b>	STANDARD		83.47474	-59.05749		20

<b>30</b>	STANDARD		150	-5	FK3	20
<b>31</b>	STANDARD		-20.30485	-4	F6	20
<b>32</b>	STANDARD		-36.3726	-10		20
<b>33</b>	STANDARD		Infinity	-5	BK7	20
<b>34</b>	STANDARD		62.22269	-27		20
<b>35</b>	STANDARD		-120	-2	K10	20
<b>36</b>	STANDARD		-110	-4	LAF22A	20
<b>37</b>	STANDARD		-60	-110		20
<b>38</b>	STANDARD		60	-4	LAF22A	20
<b>39</b>	STANDARD		110	-2	K10	20
<b>40</b>	STANDARD		120	-137.7571		20
<b>IMA</b>	STANDARD		Infinity			171.1484

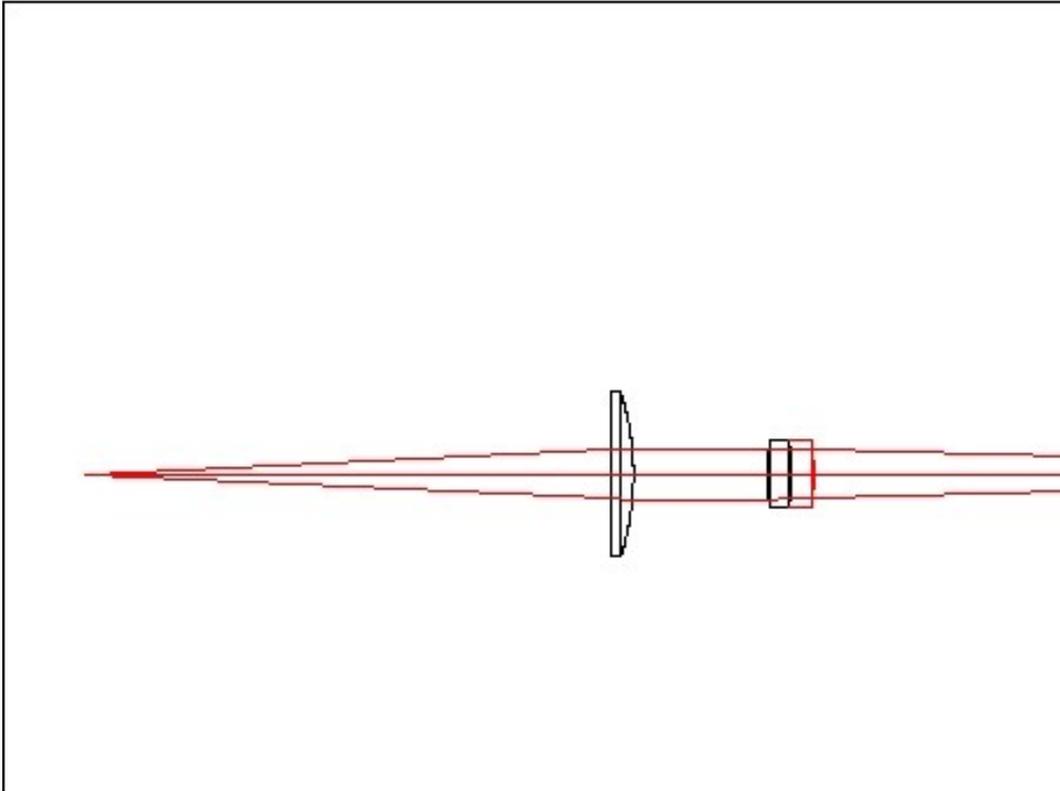
A tabela 15 traz os pontos cardinais do sistema de ampliação de 63x.

**Tabela 15: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de ampliação de 136x.**

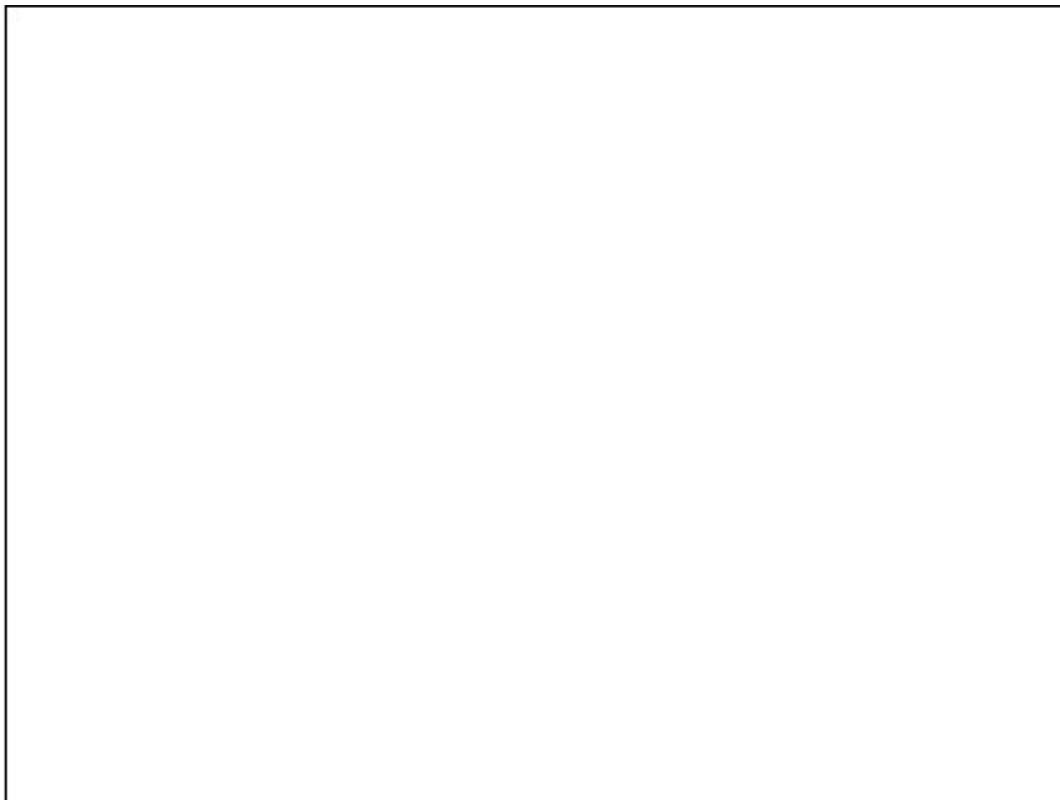
	Objeto (mm)	Imagem (mm)
Ponto Focal	-1.740502	-1.740502
Plano Focal	-117.021003	236.715364
Plano Principal	-115.280501	238.455865
Plano Anti-Principal	-118.761504	234.974862
Plano Nodal	-118.761504	234.974862
Plano Anti-Nodal	-115.280501	238.455865

Para um maior detalhamento das superfícies do sistema de ampliação de 136x vide apêndice 2, tabela II-5.

A seguir são apresentados o desenho do sistema objetiva/telescópio galileano (Figura 26), que possui um poder de ampliação de 2.16x e o desenho do projeto óptico do sistema de ampliação de 136x, Figura 27.



**Figura 26: Objetiva do Microscópio Especular para magnificação de 136x.**



**Figura 27: Sistema Óptico completo para o Microscópio Especular com magnificação de 136x.**

#### 4.1.2.5 – MAGNIFICAÇÃO DE 205X

Para a magnificação de 205x da imagem obtida pela reflexão especular, na córnea, da luz vinda do sistema iluminação, foi projetado o sistema ótico composto por 1 lente objetiva, 1 telescópio galileano formado por 2 dubletos, 1 diafragma, 1 telescópio de lentes eretoras formado por 1 lente, 6 dubletos, 1 triplete, e 1 prisma.

Os dados inseridos no *software* do ZEMAX-XE estão apresentados nas Tabelas 16 e 17.

**Tabela 16: Dados gerais do sistema de magnificação de 205x.**

Número de Superfícies	41
Superfície de Stop	1
Abertura do Sistema	20
Catalogo de Vidros	Schott
Comprimento Focal Efetivo	1.16035
Comprimento Focal Posterior	376.1903
Magnificação Paraxial	--204.6047
Diâmetro da pupila de entrada	20
Onda Primária	0.5875618 mícron
Unidade de Medida	Milímetros
Magnificação Angular	-100.8559

**Tabela 17: Dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 205x.**

Superfície	Tipo	Comentário	Raio	Espessura	Vidro	Diametro
<b>OBJ</b>	STANDARD		Infinity	117.0338		0.000408525
<b>STO</b>	STANDARD		Infinity	5	BK7	37
<b>2</b>	STANDARD		-62.22269	30		37
<b>3</b>	STANDARD		186.7249	5	FK5	15
<b>4</b>	STANDARD		-75	5	LAF22A	15
<b>5</b>	STANDARD		-120	126.8805		15
<b>6</b>	STANDARD		-160	6	FK3	9
<b>7</b>	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
<b>8</b>	STANDARD		60.2	30		9
<b>9</b>	STANDARD	diafragma	Infinity	5		20
<b>10</b>	STANDARD		Infinity	6	K10	20
<b>11</b>	STANDARD		-27.98414	3	F1	20
<b>12</b>	STANDARD		34.38204	4	F6	20

13	STANDARD		-66.82272	118.7771		20
14	STANDARD		-160	6	FK3	9
15	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
16	STANDARD		60.2	10		9
17	STANDARD		Infinity	6	K10	20
18	STANDARD		-27.98414	3	F1	20
19	STANDARD		34.38204	4	F6	20
20	STANDARD		-66.82271	118.7771		20
21	STANDARD		-160	6	FK3	9
22	STANDARD		-81.343	3	BASF2	9
23	STANDARD		60.2	20		9
24	COORDBRK		-	0		-
25	STANDARD		Infinity	0	MIRROR	20
26	COORDBRK		-	-20		-
27	STANDARD		-130	-5	FK3	20
28	STANDARD		38.12157	-4	F6	20
29	STANDARD		83.47474	-59.05749		20
30	STANDARD		150	-5	FK3	20
31	STANDARD		-20.30485	-4	F6	20
32	STANDARD		-36.3726	-10		20
33	STANDARD		Infinity	-5	BK7	20
34	STANDARD		62.22269	-27		20
35	STANDARD		-120	-2	K10	20
36	STANDARD		-110	-4	LAF22A	20
37	STANDARD		-60	-110		20
38	STANDARD		60	-4	LAF22A	20
39	STANDARD		110	-2	K10	20
40	STANDARD		120	-138.7771		20
IMA	STANDARD		Infinity			15.01365

A tabela 18 traz os pontos cardinais do sistema de magnificação de 205x.

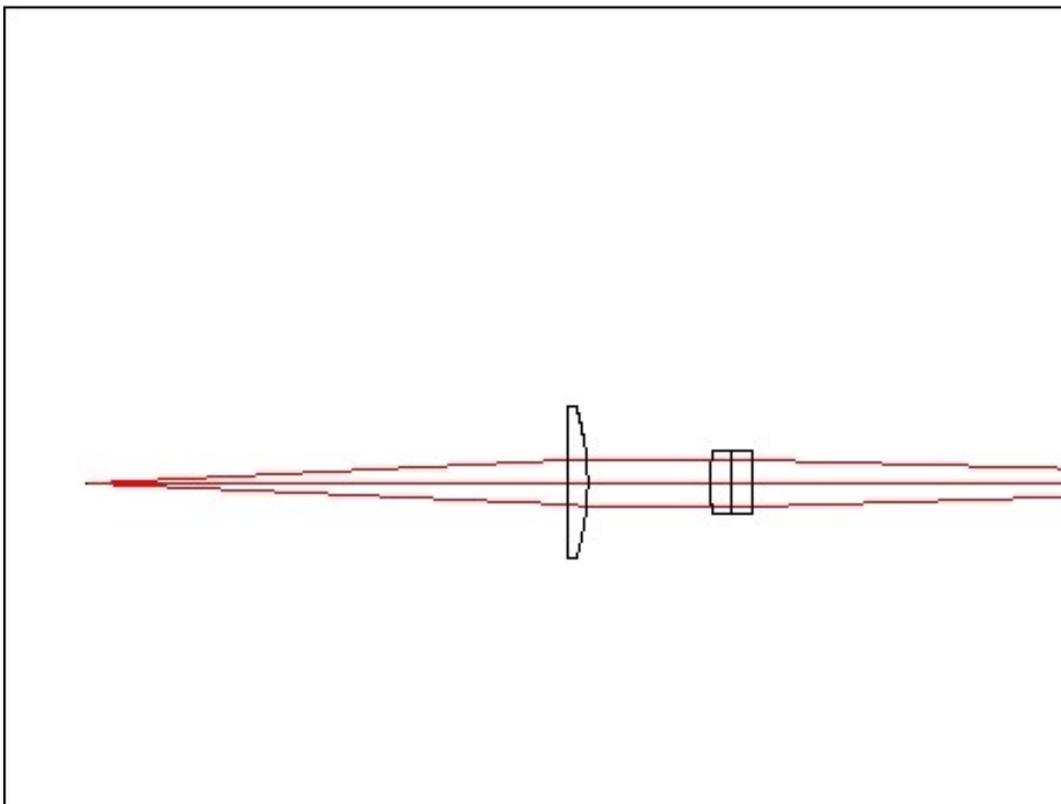
**Tabela 18: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de magnificação de 205.**

	Objeto (mm)	Imagem (mm)
Ponto Focal	-1.160350	-1.160350
Plano Focal	-117.028129	237.413127

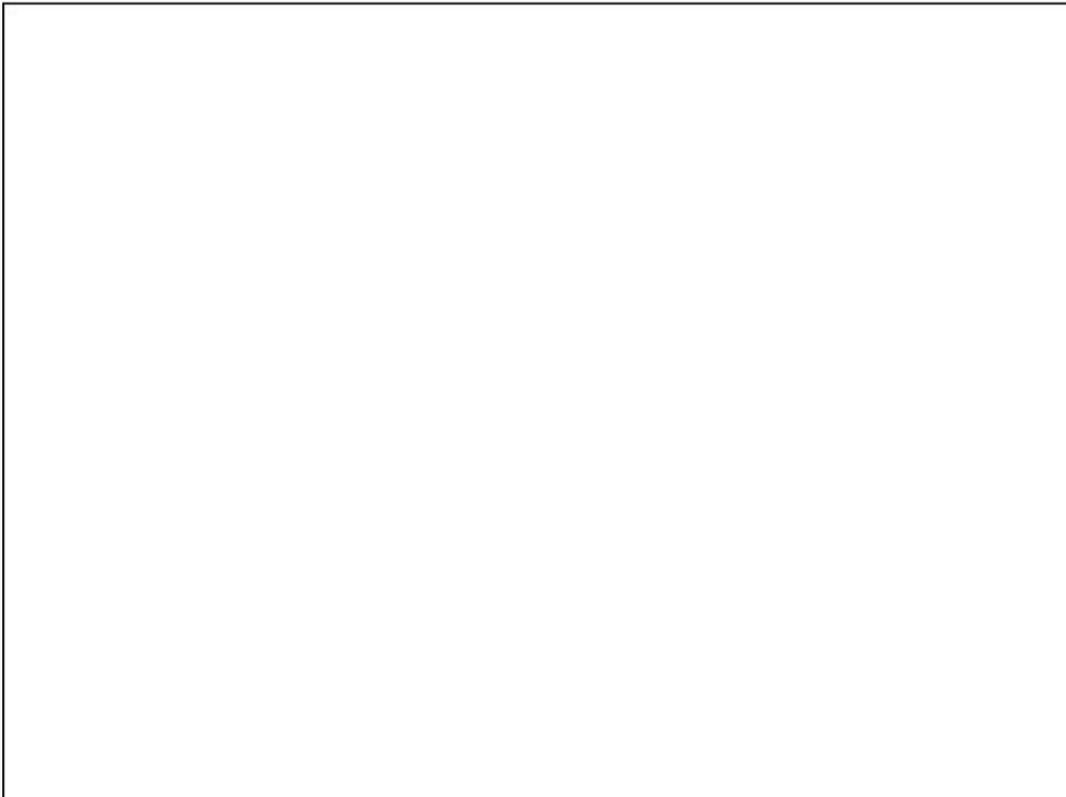
Plano Principal	-115.867779	238.573477
Plano Anti-Principal	-118.188479	236.252777
Plano Nodal	-118.188479	236.252777
Plano Anti-Nodal	-115.867779	238.573477

Para um maior detalhamento das superfícies do sistema de magnificação de 204x vide apêndice 2, tabela II-6.

A seguir são apresentados o desenho do sistema objetiva/telescópio galileano (Figura 28), que possui um poder de magnificação de 3.2x e o desenho do projeto óptico do sistema de magnificação de 205x, Figura 29.



**Figura 28: Objetiva do Microscópio Especular para magnificação de 205x.**



**Figura 29: Sistema Óptico completo para o Microscópio Especular com magnificação de 205x.**

#### 4.2 MONTAGEM DO SISTEMA ÓTICO

A confecção do sistema óptico foi feita a partir de lentes existentes no L.F.O., de sucatas de Lâmpadas de Fenda adquiridas no depósito do HC-FMRP/USP e de peças confeccionadas em oficina de precisão. Para a elaboração dos projetos ópticos foi levado em consideração, quando possível, o material óptico disponível no LFO.

O **sistema de captura de imagem** é composto por uma câmera CCD da WATEC-902-HS (Figura 30), de área de sensor de 1/2", que possui uma sensibilidade de 0,00015lux, resolução de 570 linhas de tv, 380K Pixels e relação sinal/ruído maior do que 50dB e por uma placa de captura de vídeo Meteor I da Matrox.

A imagem disponibilizada pelo sistema de magnificação é detectada pelo CCD e transmitida para a placa de captura de vídeo que disponibiliza a imagem num monitor de um micro computador do tipo PC em tempo real.

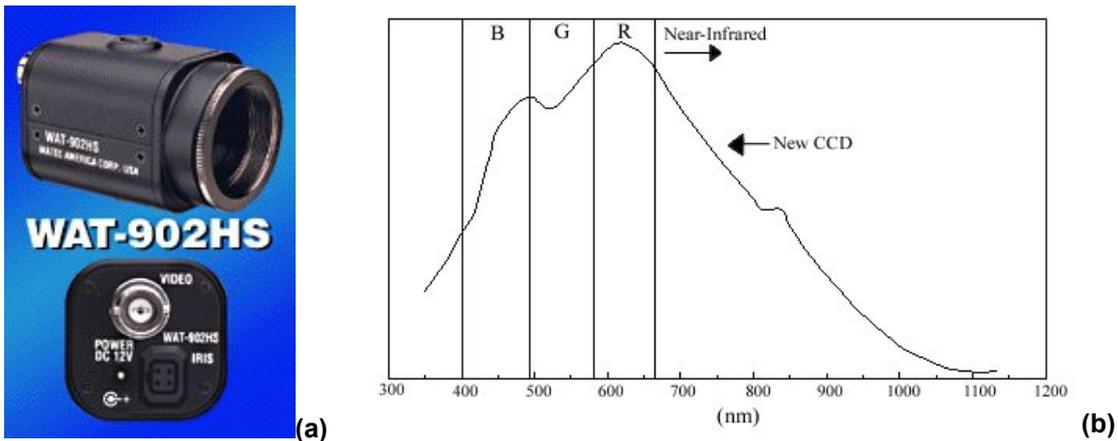


Figura 30: (a) foto do CCD utilizado; (b) curva característica de resposta do CCD para os vários comprimentos de onda, onde o sistema RGB é mostrado (red, green, blue).



Figura 31: Foto do Microscópio Especular montado em Bancada Óptica

### 4.3 SOFTWARE DE MICROSCOPIA ESPECULAR UTILIZADO

#### 4.3.1 DENSIDADE CELULAR

Parte do **sistema computacional** é composto por um *software* de contagem de células endoteliais *in vitro* em Lâmpada de Fenda e com banco de dados.

Este *software* possui um algoritmo para a determinação automática ou interativa da densidade celular. Para a contagem interativa o usuário desenha em uma determinada área da imagem da camada endotelial uma janela envolvendo algumas células (da ordem de 30 células), vide Figura 32, e marca com o *mouse* as células que estão contidas naquela janela. Então, seleciona a

opção CALCULAR e o programa estima o número de células/mm<sup>2</sup> existentes naquela córnea. Para a contagem automática basta que o usuário desenhe numa determinada área da imagem da camada endotelial, uma janela envolvendo algumas células (da ordem de 30 células), e a seguir, seleciona a opção CONTAR e o programa estima o número de células/mm<sup>2</sup> existentes naquela córnea, vide Figura 33.

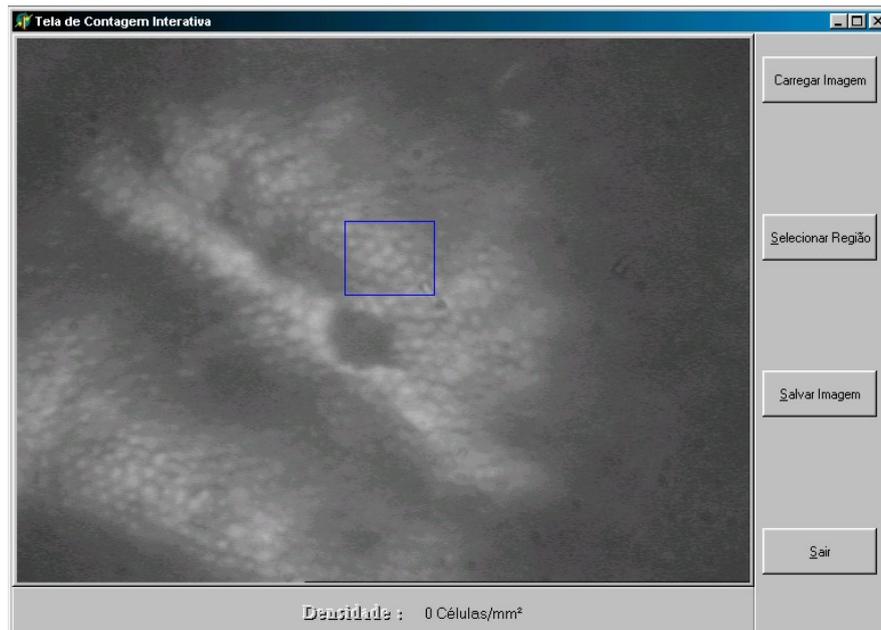


Figura 32: Tela do sistema de contagem interativo utilizando o método de seleção de área por retângulo.



Figura 33: Tela do Sistema Automático de Calculo de Densidade de Células Endoteliais.

O sistema permite ainda que o usuário possa, ao invés de desenhar uma janela envolvendo as células, desenhar livremente um contorno que envolva as células sem que este contorno delimite algumas delas pela metade, como é o caso da janela, tornando ainda melhor a precisão das medidas<sup>(2)</sup>.

#### 4.3.2 ÍNDICES DE PLEOMORFISMO E POLIMEGATISMO<sup>(2)</sup>

Utilizando os resultados disponibilizados pelo sistema de cálculo de densidade celular, foram desenvolvidos, em projetos anteriores do grupo <sup>(1 - 2)</sup>, dois programas (em *Delphi*) para calcular a variação no tamanho (Polimegatismo) e no formato (Pleomorfismo) nas imagens da camada endotelial da córnea, obtidas pela Lâmpada de Fenda (LF).

Estes programas foram fundidos ao programa para cálculo da densidade de células da córnea, na tela do programa principal foram acrescentados os ícones de “Pleomorfismo” e “Polimegatismo”, vide Figura 34. Estas funções só podem ser utilizadas após o programa principal detectar e identificar as células, pois elas utilizam estes resultados como parâmetros de entrada para executar a análise.



Figura 34: Ícones para cálculo de Polimegatismo e Pleomorfismo acrescentados à tela principal

#### 4.3.2.1 POLIMEGATISMO

Após o programa principal realizar a identificação das células, ele gera uma imagem final resultante, Figura 35, onde todas as células estão identificadas como regiões contínuas com tonalidades em cinza, diferentes.

A partir deste momento a função para análise de Polimegatismo percorre a imagem procurando o número total de pixels rotulados, que existe para cada cor de identificação. Então, valores multiplica-se o valor de calibração de área por eles e obtém-se o valor da área que cada célula tem<sup>(2)</sup>, permitindo assim, traçar um gráfico, Figura 36, onde observa-se a distribuição de área entre as células presentes na imagem.

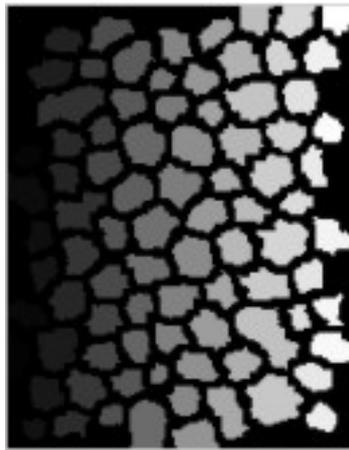


Figura 35: Imagem das células identificadas.<sup>(2)</sup>

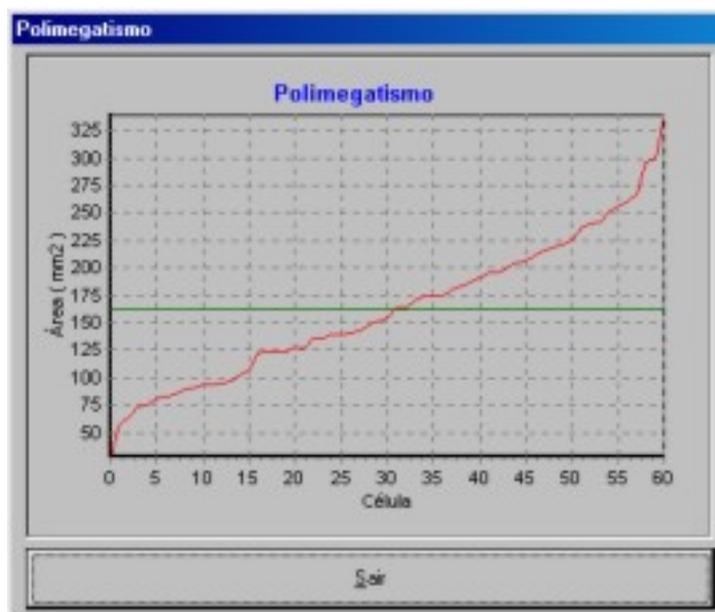


Figura 36: Gráfico da distribuição de área (Polimegatismo) entre as células presentes na imagem.<sup>(2)</sup>

#### 4.3.2.2 PLEOMORFISMO

Utilizando o resultado obtido pelo programa principal, Figura 34, o programa para análise de Pleomorfismo executa uma seqüência de cálculos, descritos na tese de doutorado de Cesar A. Cardoso Caetano, para obter o valor do raio do maior círculo inscrito na imagem da célula e o valor do raio do menor círculo circunscrito à mesma célula. Então, calcula-se a razão entre o raio menor e o raio maior e constrói-se um gráfico, onde é possível observar o comportamento morfológico das células examinadas na imagem.

Tanto o índice de Pleomorfismo como o de Polimegatismo indicam ao clínico que pode ter ocorrido uma grande morte de células na região analisada e isso pode ser um forte indício sobre a qualidade da córnea examinada. Estes valores agregam ao valor de densidade celular, valores quantitativos que possibilitam ao examinador estabelecer um laudo mais preciso e confiável já que, este dispõe de informações de distribuição (densidade), forma e tamanho.

O processo citado é realizado para todas as imagens rotuladas, das células encontradas na imagem analisada. Após concluir a análise, um vetor com os valores do índice de pleomorfismo está criado e seus valores são utilizados para gerar um gráfico, onde é possível observar as variações de formato no conjunto de células analisadas, (Figura 33).

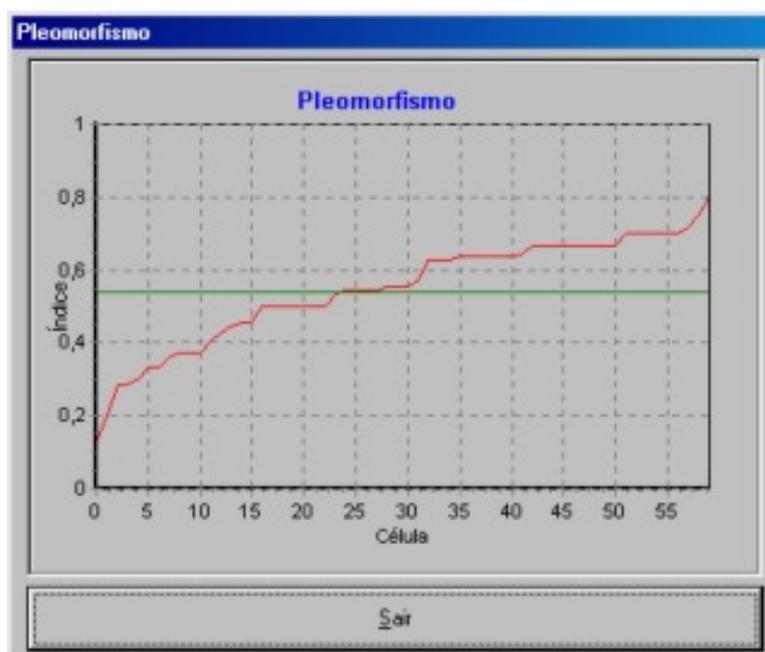


Figura 37: Gráfico da distribuição de variação de formato (Pleomorfismo) entre as células presentes na imagem.<sup>(2)</sup>

## **5 - RESULTADOS**

Neste capítulo serão apresentados os resultados do sistema ótico projetado, que contém as análises das aberrações, dos diagramas de *spot*, e da distribuição de energia na imagem dos 6 projetos óticos do microscópio especular; os resultados da montagem do sistema em bancada ótica, as imagens obtidas pelo sistema desenvolvido de retículos de calibração e de córneas humanas.

### 5.1 – AVALIAÇÃO DO SISTEMA PROJETADO

#### 5.1.1 SISTEMA DE ILUMINAÇÃO

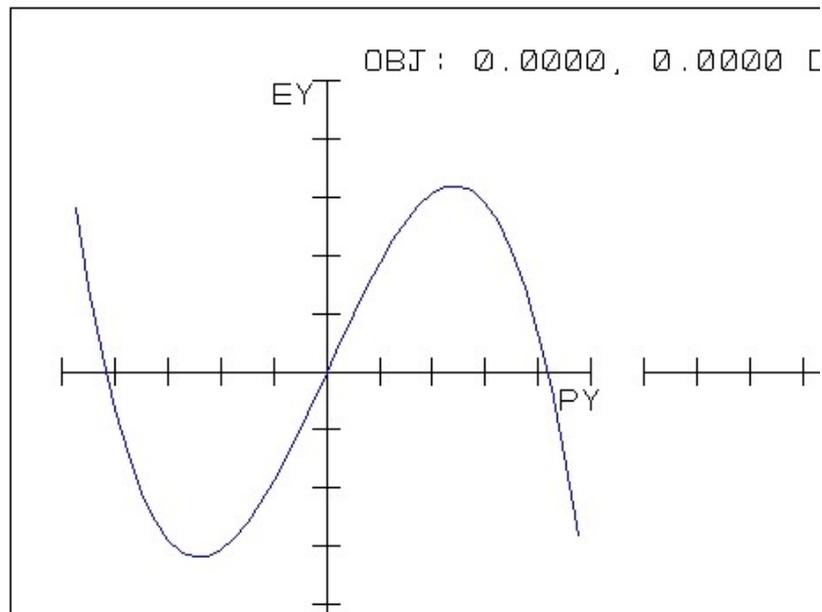
Nesta parte do projeto são feitas as avaliações do sistema de iluminação projetado para o M.E. (consulte o Apêndice I para maiores esclarecimentos referente às avaliações óticas). São elas:

- *Ray Fan* (Demonstra a aberração de raio como função das coordenadas da pupila);
- *OPD Fan* (Demonstra a diferença de caminho ótico como função das coordenadas da pupila);
- *Pupil Aberration Fan* (Demonstra as distorções que ocorrem como função das coordenadas da pupila de entrada);
- *Spot Diagram* (Demonstra através de um diagrama de *spot* as aberrações do sistema);
- *Through Focus Spot Diagram* (Demonstra a variação do diagrama de spot com a variação do plano focal da imagem);
- *FFT PSF Cross Section* (Demonstra uma seção transversal do sólido de distribuição da energia calculado a partir de um algoritmo FFT);
- *Image Diagram* (Simula uma imagem produzida pelo sistema ótico);

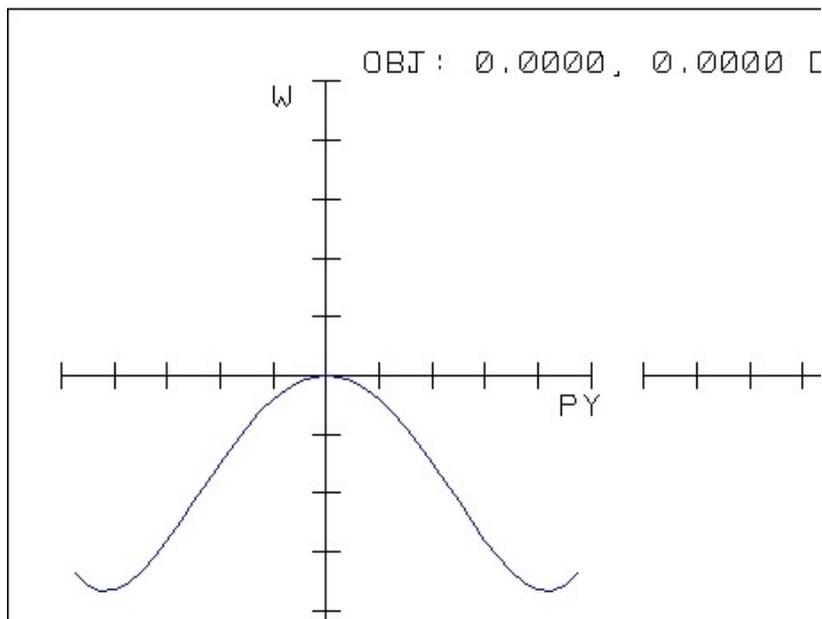
#### 5.1.1.1 – AVALIAÇÃO DE ABERRAÇÕES

Podem ser observadas na Figura 38 as aberrações de raio que ocorrem em função das coordenadas  $x$  e  $y$  da pupila do sistema de iluminação. Como ilustrado pelo gráfico esta aberração possui um valor aproximado de  $64\mu\text{m}$ , este valor indica a distância entre o ponto focal referente aos raios da borda e o ponto focal referente aos raios paraxiais da lente (o ideal seria que fosse zero). Na Figura 39 observa-se a diferença de caminho ótico que ocorre em função

das coordenadas x e y da pupila do sistema de iluminação. Como ilustrado pelo gráfico, a diferença de caminho óptico possui um valor aproximado de -0.64 unidade de onda (waves). Na Figura 40 observam-se as distorções que ocorrem na imagem como função das coordenadas da pupila de entrada do sistema de iluminação. Estas distorções possuem um valor aproximado de 0.22%



**Figura 38: Aberração de Raio do Sistema de Iluminação do M.E., em X ele atinge uma escala máxima de 20 microns.**



**Figura 39: OPD Fan do Sistema de Iluminação do M.E.**

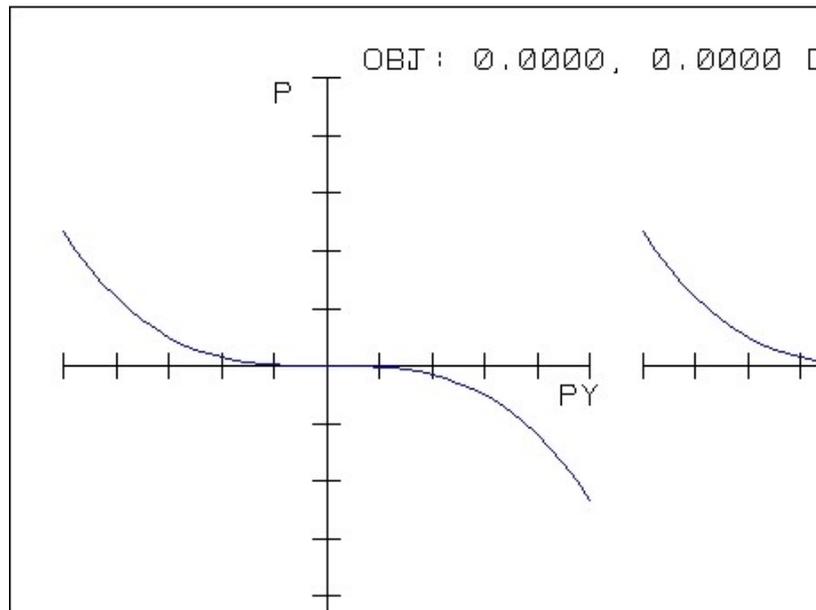


Figura 40: Aberração de Pupila de Entrada do Sistema de Iluminação do M.E.

#### 5.1.1.2 – AVALIAÇÃO POR DIAGRAMAS DE SPOTS

Nas Figuras 41 e 42 podem-se avaliar as aberrações do sistema de iluminação pelo diagrama de *spot*. Na Figura 41 observam-se dois diagramas de *spot*: em *a* tem-se a fenda retangular, com abertura máxima  $e$ ; em *b*, com abertura mínima. Em *a* o diagrama apresenta um raio de  $63.685\mu\text{m}$  e, em *b*, apresenta um raio de  $63.186\mu\text{m}$  (esta diminuição no diâmetro do *spot* ocorre devido à diminuição de raios no sistema, diminuindo, conseqüentemente, as aberrações). Nota-se em *a* o aspecto circular do diagrama do sistema, indicando que ele está livre de astigmatismo. Na Figura 42 pode-se observar que a variação entre o diâmetro do *spot* e a do plano focal é inexistente, pois o raio do *spot* se mantém a  $63.685\mu\text{m}$ .

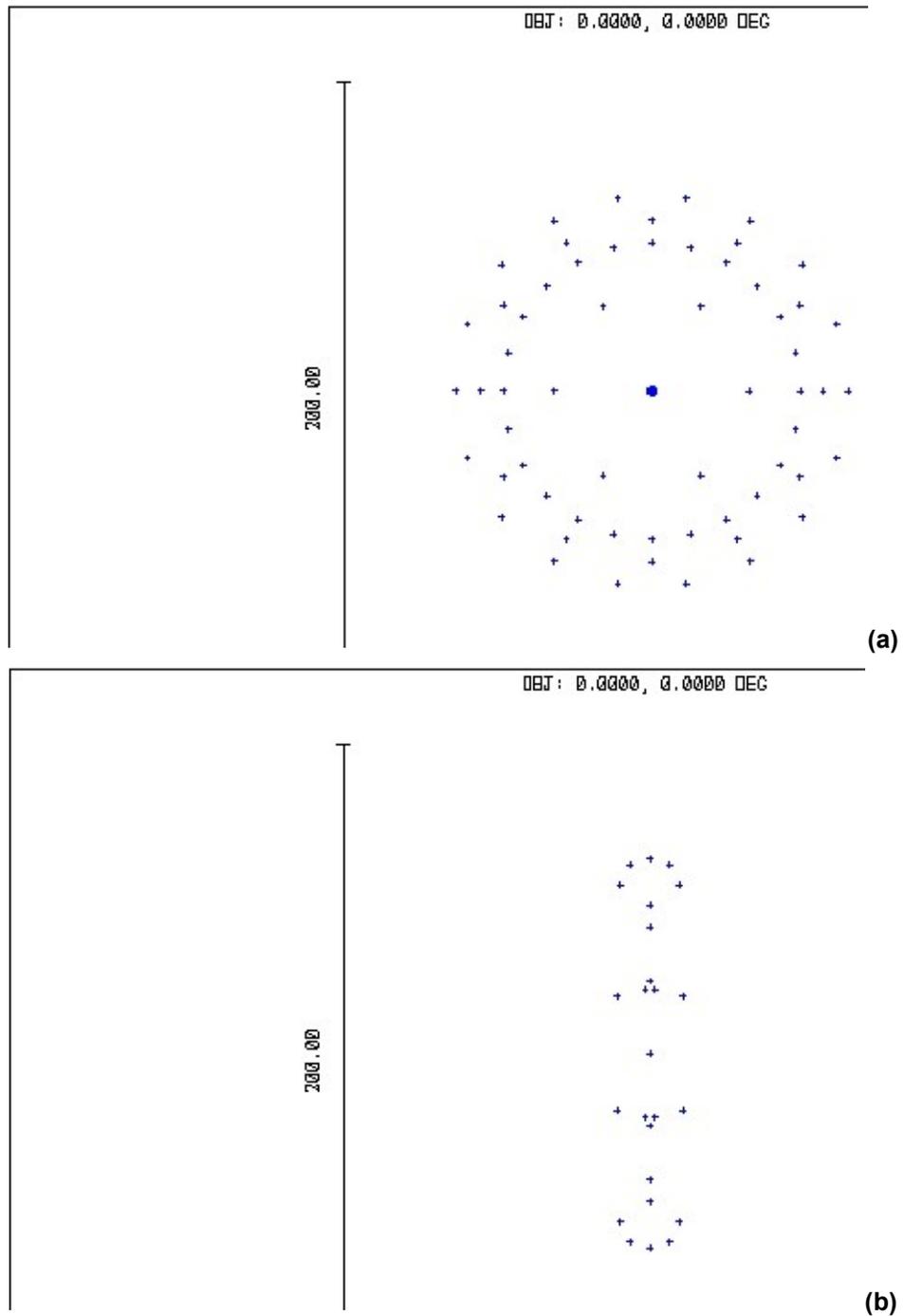


Figura 41: Diagrama de Spot do Sistema de Iluminação do M.E. (a) Diagrama de Spot com a abertura máxima da fenda retangular (5mm de largura). (b) Diagrama de spot com a abertura mínima da fenda retangular (0.5mm de largura).

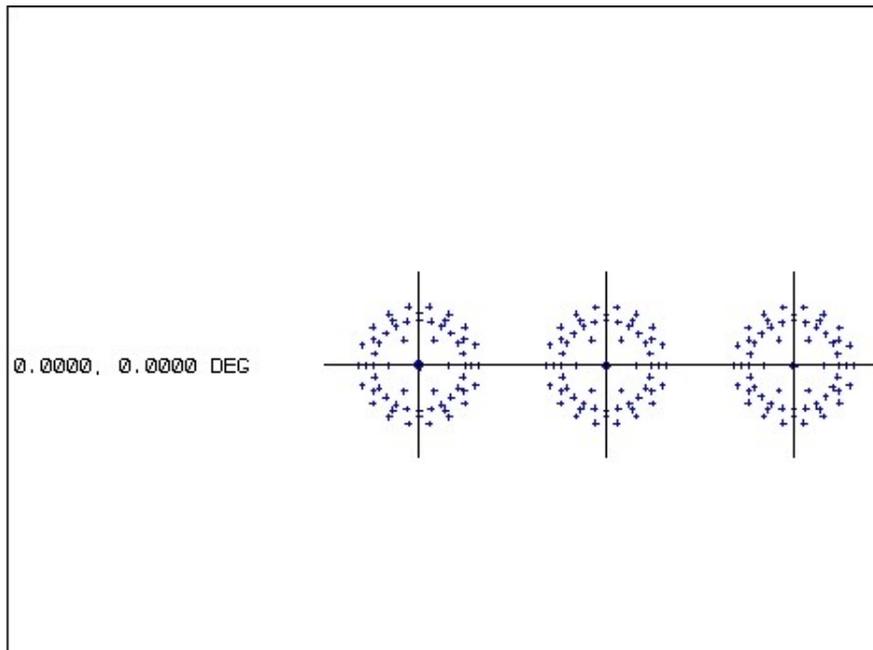


Figura 42: Variação do Diagrama de Spot com a variação do plano focal da imagem do Sistema de Iluminação do M.E.

#### 5.1.1.3 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ENERGIA NA IMAGEM

Na Figura 43 temos uma seção transversal do sólido de distribuição da energia calculado a partir de um algoritmo FFT. Pode-se observar que a maior parte da energia se concentra no pico central, o que leva a afirmar que o sistema possui um ótimo padrão de difração, uma vez que um sistema ótimo possui em torno de 84% de energia no pico central (vide apêndice II).

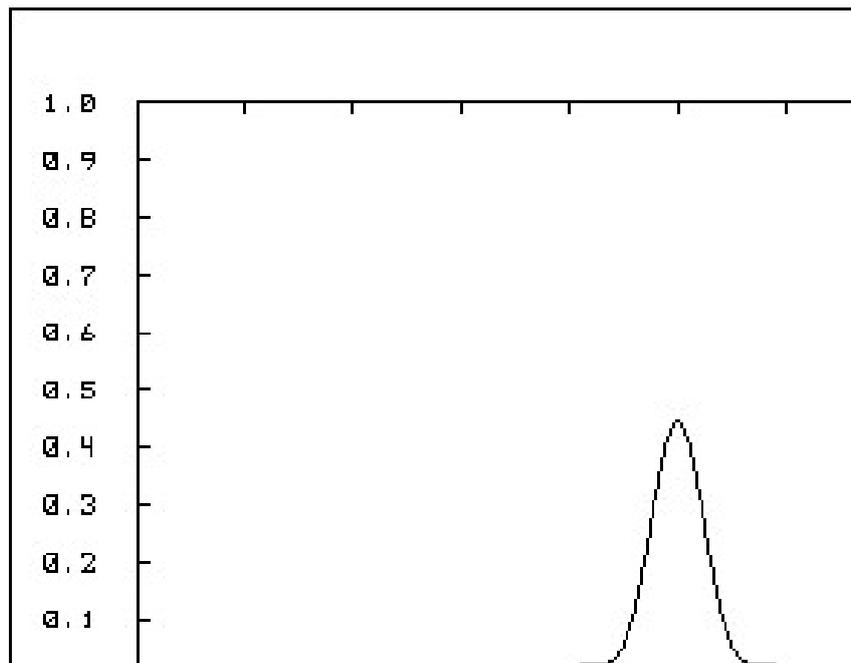


Figura 43: Seção Transversal da FFT-PSF do Sistema de Iluminação do M.E.

#### 5.1.1.4 – AVALIAÇÃO DA IMAGEM

Na Figura 44 tem-se a simulação da imagem de uma letra que seria produzida pelo sistema de iluminação do M.E., se fosse observada através dele. Por esta Figura pode-se verificar o quanto a imagem esta nítida e livre de aberrações.

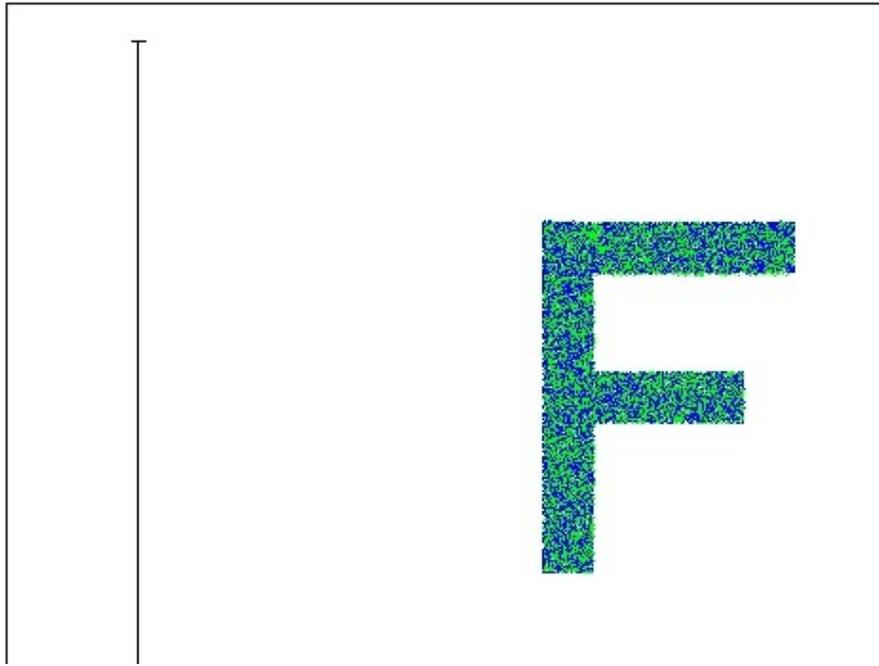


Figura 44: Simulação da imagem produzida pelo Sistema de Iluminação do M.E., quando a letra “F” é o objeto de observação.

Analogamente, para os sistemas de magnificações, as análises são realizadas e estão mostradas sucintamente na tabela 19.

As Figuras detalhadas destas análises dos sistemas de magnificação estão no Apêndice IV.

Tabela 19: Dados relativos as aberrações apresentadas pelo Zemax para os sistemas ópticos de magnificação do Microscópio Especular.

	<b>20x</b>	<b>30x</b>	<b>63x</b>	<b>136x</b>	<b>204x</b>
<b>Aberração de Raio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	260	200	190	300	25
<b>Diferença de Caminho Óptico (unidade de onda)</b>	-0.056	-0.032	-0.05	0.025	0.0005
<b>Aberração de Pupila (%)</b>	0	0	0.06	0	0
<b>Diâmetro do Diagrama de Spot (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	0	0	0	106.776	0

## 5.2 AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE MICROSCOPIA ESPECULAR

Nesta parte do projeto é feita a apresentação do sistema de microscopia especular montado na bancada óptica e são feitas também as avaliações das imagens de retículos de calibração e de córneas humanas doadas (cedidas ao L.F.O. pelo Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto), imagens estas capturadas através do sistema montado em bancada ótica.

### 5.2.1 SISTEMA DE MICROSCOPIA ESPECULAR MONTADO EM BANCADA ÓPTICA

O sistema montado em bancada, a partir do projeto de desenho ótico descrito no capítulo 4, e avaliado nos itens anteriores deste capítulo está ilustrado através da foto da Figura 45, onde a numeração correspondente é descrita por:

- 1 é o sistema de iluminação;
- 2 é o suporte para frasco preservativo de córnea;
- 3 é o frasco preservativo de córnea;
- 4 é o sistema objetiva/telescópio Galileano;
- 5 é o telescópio de lentes eretoras;
- 6 é a câmara C.C.D.;
- 7 é o monitor do computador, que contém a placa de captura de vídeo e o *software* para tratamento e visualização das imagens capturadas



**Figura 45: Foto do Sistema de Microscópio Especular montado em Bancada Óptica**

A Figura 46 traz em destaque os principais componentes do sistema de iluminação do microscópio especular. O sistema de iluminação está representado por 1, o suporte para frasco preservativo de córnea, por 2, o frasco preservativo de córnea, por 3, e por 4, a objetiva do M.E.



**Figura 46: Foto do Sistema de Microscópio Especular montado em Bancada Óptica, destacando o sistema de iluminação, o suporte para o frasco preservativo, e a objetiva.**

Na Figura 47, temos a foto em destaque do sistema objetiva/telescópio galileano do M.E.



**Figura 47: Foto do Sistema Objetiva/Telescópio Galileano do M.E.**

O botão branco na Figura 47 serve para girar os dois telescópios Galileano e proporcionar as cinco magnificações oferecidas pelo M.E.. O sistema de microscopia especular montado em bancada óptica possui magnificações reais de 24x, 40x, 64x, 100x e 160x.

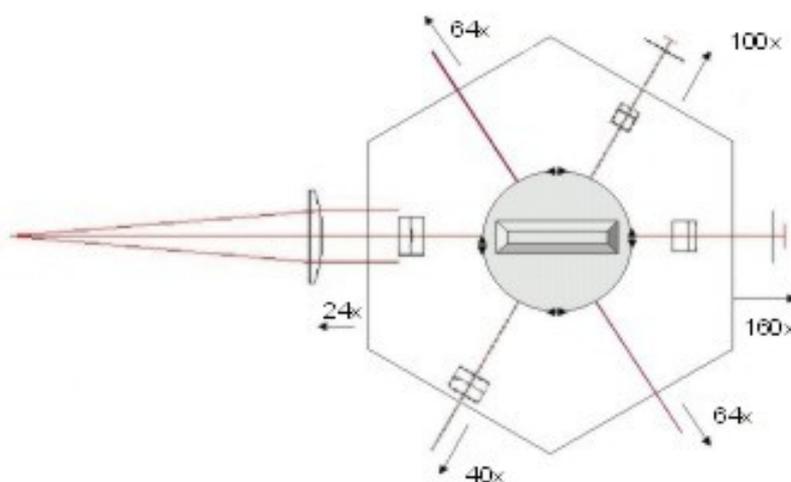
As várias magnificações foram mensuradas, com precisão, através de comparação da imagem obtida por um sistema padrão calibrado em 25X.

Estas magnificações reais diferentes da projetada ocorreram devido ao fato das lentes confeccionadas não estarem com a exatidão de foco, como é em um projeto, e, portanto, as distâncias entre os componentes óticos foram ligeiramente alteradas, não fugindo de forma relevante do projeto original. A propagação destas imprecisões leva a alterações na magnificação final do sistema, principalmente por se tratar de um sistema de aumento. Como a magnificação maior do sistema ficou sendo exatamente a magnificação adotada comercialmente, 160X, resolveu-se que a montagem em bancada prosseguiria desta forma.

Na Figura 48 temos um desenho esquemático de como estão dispostos os telescópios Galileanos Quando se deseja mudar a magnificação do M.E., basta girar o botão, cada telescópio Galileano possui dois aumentos:

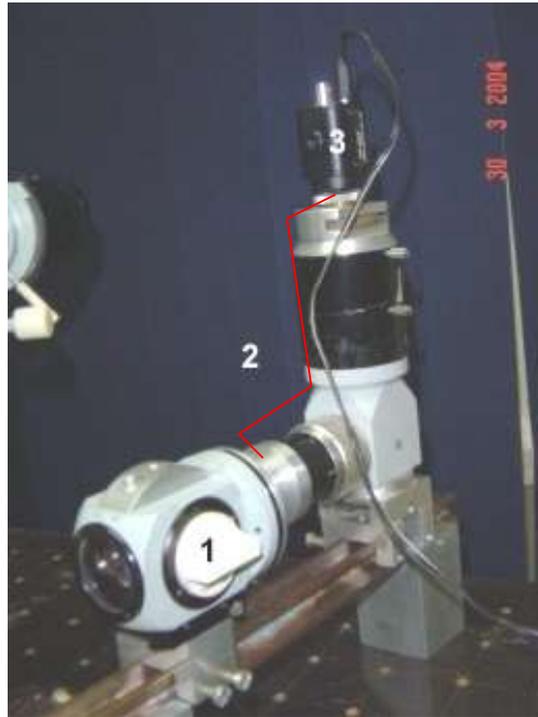
- **O telescópio 1:** proporciona magnificação final de 24x e 160x.
- **O telescópio 2:** proporciona magnificação final de 40x e 100x

Para o aumento de 64x não se tem o telescópio Galileano, daí o motivo do sistema óptico do M.E. possuir o mesmo aumento duas vezes.



**Figura 48: Desenho esquemático do Sistema Objetiva/Telescópio galileano do M.E.**

A Figura 49 mostra em destaque o sistema de magnificação do sistema de microscopia especular e de obtenção das imagens no CCD. Nesta foto pode-se observar em 1 o sistema Objetiva/telescópio Galileano, que proporciona as multi-magnificações do sistema; em 2 o sistema de magnificação definitiva de 64x, que é formado por um telescópio de lentes eretoras; e em 3 a câmara C.C.D.



**Figura 49: Foto em destaque do Sistema de magnificação do M.E.**

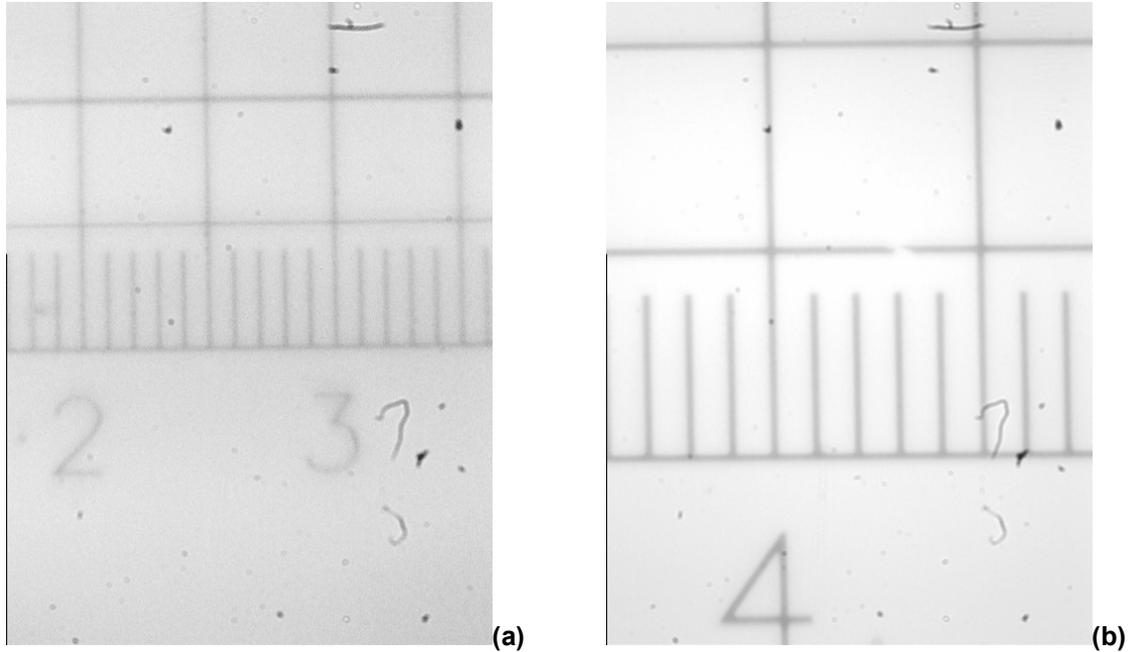
#### 5.2.2 AVALIAÇÃO DE IMAGENS CAPTADAS PELO SISTEMA DE MICROSCOPIA ESPECULAR MONTADO EM BANCADA ÓPTICA

Uma vez montado o microscópio especular em bancada óptica, foi realizada a calibração do sistema. O método utilizado para realizar a calibração do M.E. foi capturar imagens de retículos de precisão, para realização dos devidos ajustes. O primeiro retículo utilizado foi um da *Edmunds Scientific*, com graduação de 0.1mm, fixado sobre a superfície de um vidro plano e transparente

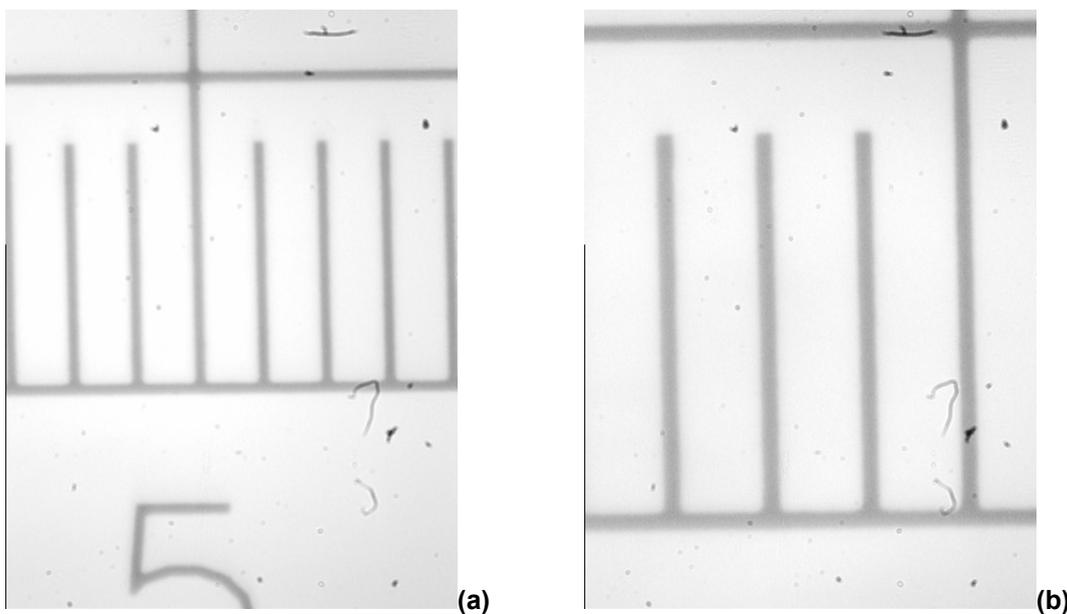
Nas Figuras 50 e 51 podem-se observar as fotos capturadas pelo sistema de microscopia especular. A Figura 50 apresenta duas fotos: em *a* tem-se a imagem do retículo com magnificação de 40x e, em *b*, com

magnificação de 64x. Na Figura 51 tem-se em *a* a imagem do retículo com magnificação de 100x e, em *b*, com magnificação de 160x.

É possível observar que tanto na Figura 50 quanto na Figura 51 as fotos são nítidas e livres de aberrações.



**Figura 50:** Reticulo calibrador plano com graduação de 0.1mm, da *Edmunds Scientific*.  
(a) Foto capturada pelo M.E., com magnificação de 40x. (b) Foto capturada pelo M.E., com magnificação de 64x.



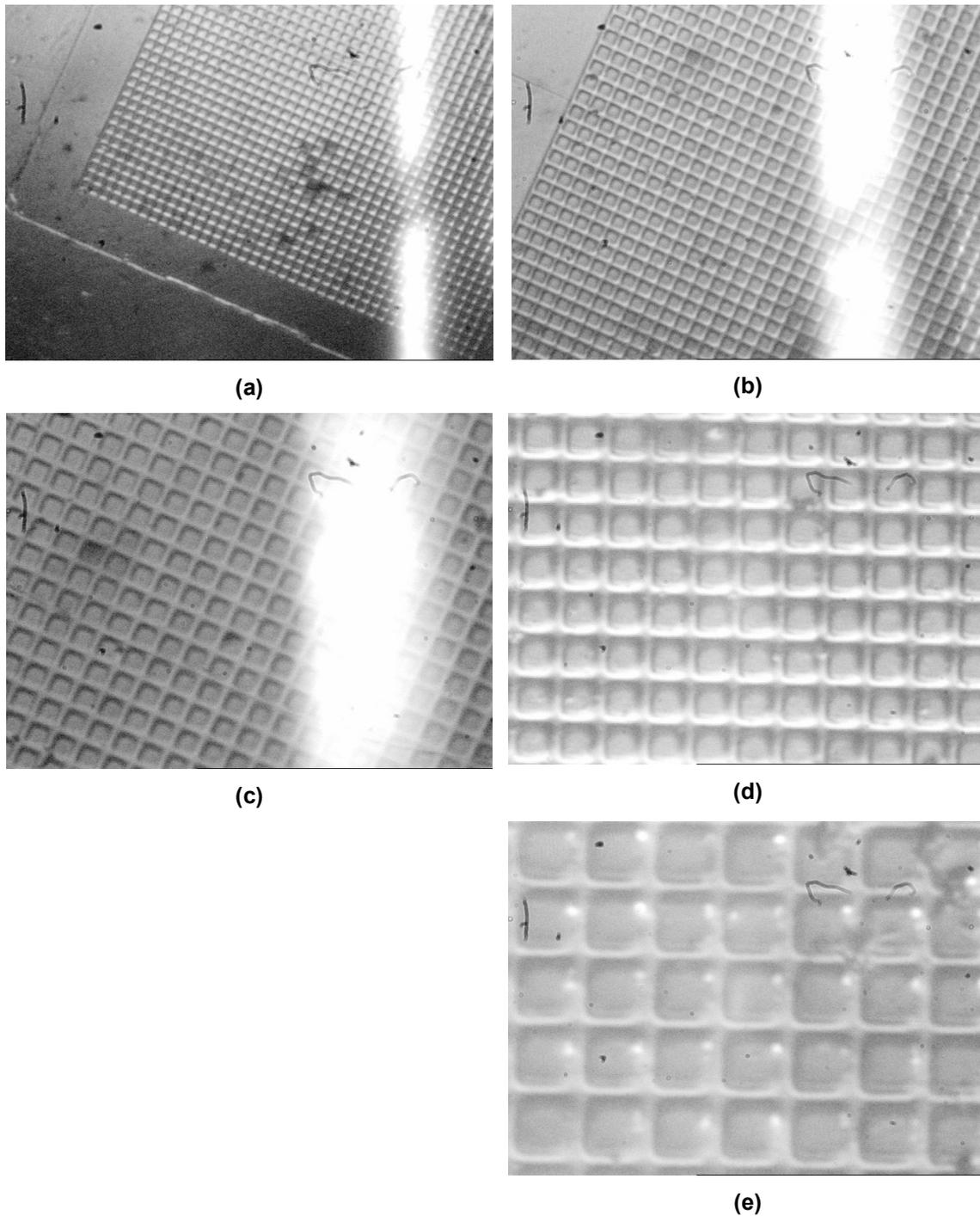
**Figura 51:** Reticulo calibrador plano com graduação de 0.1mm, da *Edmunds Scientific*.  
(a) Foto capturada pelo M.E. com magnificação de 100x. (b) Foto capturada pelo M.E. com magnificação de 160x.

O retículo utilizado para capturar as imagens apresentadas nas Figuras 50 e 51 foi colocado dentro do suporte para frasco preservativo de córnea, e com a face do retículo voltada para a objetiva do M.E.. Este processo colaborou para a captura de uma imagem nítida, já que entre a face anterior da objetiva e face do retículo existe apenas o meio ambiente.

O passo seguinte foi utilizar um retículo padrão, utilizado em microscópios especulares comerciais, com uma grade reticular com dimensão tão pequena quanto à de uma célula endotelial. Tendo em vista que uma célula endotelial mede em torno de  $16\mu\text{m}$ , utilizamos um retículo com  $50\mu\text{m}$  de graduação.

Este segundo retículo, da *Bioptics*, além de sua graduação adequada, possui uma peculiaridade: ele é depositado sobre uma calota-esférica de vidro, com raio de curvatura em torno de  $7,8\text{mm}$  (raio de curvatura aproximado da córnea humana), o que permitiu fazer uma simulação bem próxima da córnea. O retículo foi colocado dentro de um frasco com o líquido rosado, preservativo OPTISOL para preservação de córneas, cedido pelo Banco de Olhos do HCRP. As imagens capturadas podem ser observadas na Figura 52.

Observando as imagens da Figura 52, pode-se observar que estas também são imagens nítidas e livres de aberrações, porém vale lembrar que mesmo simulando todas as condições em que a imagem da camada de células endoteliais é capturada, a reflexão na superfície do retículo calibrador ainda é bem maior (10%) do que a reflexão proporcionada pela camada de células endoteliais da córnea (0.022%).



**Figura 52: Reticulo calibrador semi-esférico com graduação de 50 µm, da *Bioptics*. Foto capturada pelo M.E. com magnificação de: (a) 24x, (b) 40x, (c) 64x, (d) 100x, (e) 160x.**

Uma vez ajustado o sistema de microscopia especular para a visualização do retículo semi esférico, passou-se à visualização de córneas doadas, gentilmente cedidas pelo Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. As córneas fornecidas pelo Banco de Olhos foram as preservadas, que são aprovadas num pré-processo de avaliação de córneas

doadas. As córneas liberadas para preservação são colocadas em frasco com líquido rosado preservativo (OPTISOL) e mantidas refrigeradas.

Como o processo de retirada de uma córnea é bastante caro para o Banco de Olhos, o processo de retirada de córneas que seriam desprezadas, devido à causa da morte, não foi adotado por este motivo.

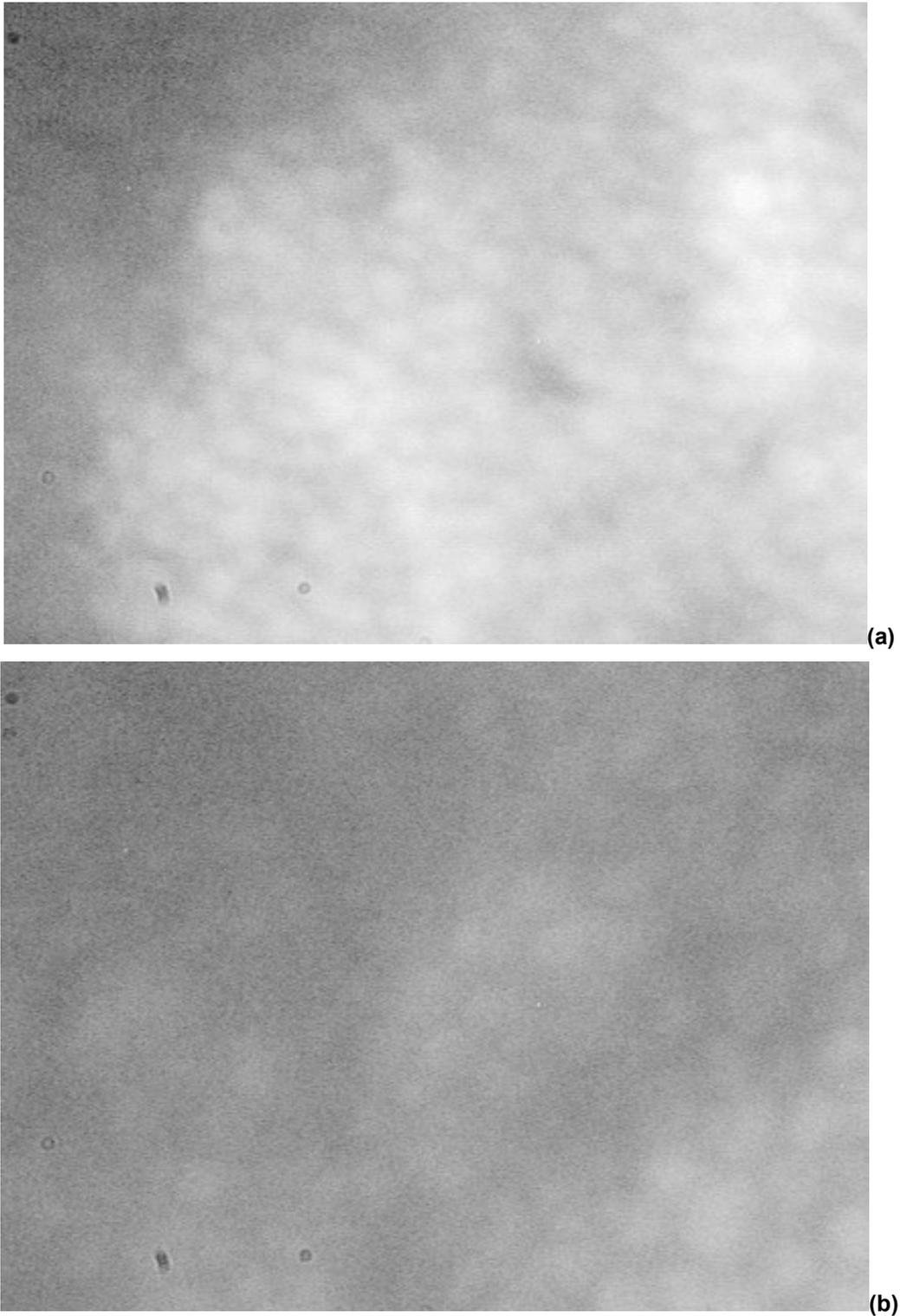
O tempo de uso também é limitado, pois a córnea deve retornar à refrigeração em 20 minutos, evitando desta forma a perda do tecido. Dentro destes 20 minutos é preciso esperar de 7 a 10 minutos para que a córnea atinja a temperatura ambiente e restabeleça as condições para visualização do endotélio.

A visualização das células endoteliais da córnea podem ser guiadas através dos clarões observados em magnificações inferiores à 100X. Desta forma o usuário percorre a córnea até encontrar este clarão (vide Figura 53) e a partir daí, escolhe uma magnificação maior para observar o endotélio.

A Figura 54 mostra as imagens da camada de células endoteliais da córnea para uma magnificação de 100x e 160X.



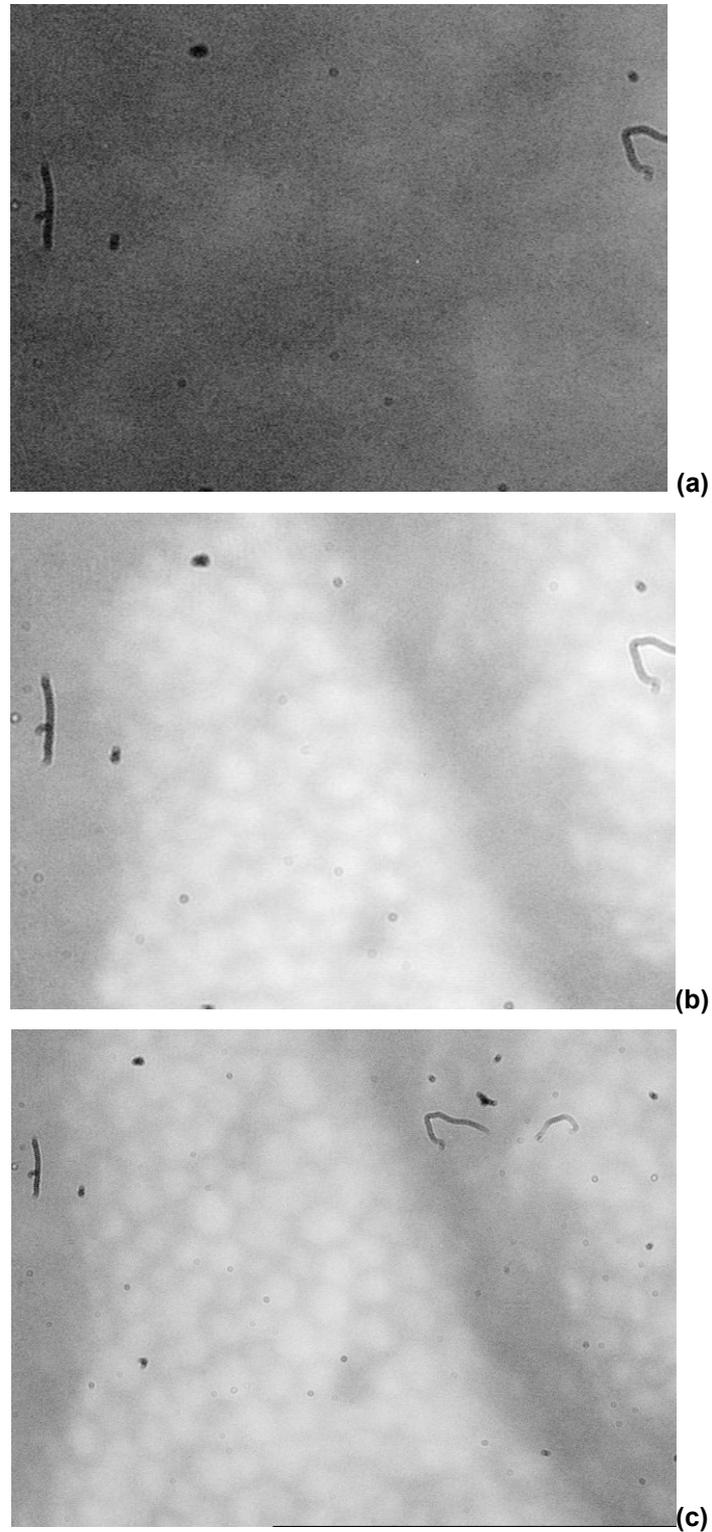
**Figura 53: Camada de células endoteliais da córnea. Magnificação de 64x. Córnea cedida pelo Banco de Olhos do HCRP em 03/02/2004.**



**Figura 54: Camada de células endoteliais da córnea. Córnea cedida pelo Banco de Olhos do HCRP em 03/02/2004. (a) Magnificação de 100x; (b) Magnificação de 160x.**

Na Figura 55 tem-se uma outra seqüência de imagens, capturadas pelo microscópio especular, de uma córnea doada e cedida pelo Banco de Olhos do

HCRP ao L.F.O.. Em (a) temos a imagem com magnificação de 64x, em (b) com magnificação de 100x e em (c) com magnificação de 160x.



**Figura 55: Camada de células endoteliais da córnea humana. (a) Magnificação de 64x; (b) Magnificação de 100x; (c) Magnificação de 160x.**

Foi utilizado o *software* desenvolvido previamente no LFO<sup>(2)</sup> que faz a avaliação da camada de células endoteliais. Uma avaliação do *software* não foi feita nesta dissertação, pois ele já foi amplamente validado em outros trabalhos e teses do grupo.

O que nos interessa no momento é a qualidade de visualização do endotélio e estar corroborando a real ampliação do sistema.

Como a avaliação da ampliação do sistema foi previamente analisada e seus valores obtidos, a contagem interativa de células endoteliais e comparação do resultado com a contagem interativa de um microscópio comercial servem para orientar se o sistema além de proporcionar avaliações subjetivas (imagens de boa qualidade) ele também está calibrado para fornecer laudos objetivos.

Para a córnea apresentada na Figura 55, a densidade celular obtida pela contagem interativa das células foi de 2.276 cel/mm<sup>2</sup> em nosso sistema, enquanto que para a contagem feita pelo microscópio especular, (da KONAN, modelo EKA-98), do Banco de Olhos do HCRP foi de 2700 cel/mm<sup>2</sup>. Esta diferença ocorre devido a diferentes regiões de uma mesma córnea observada.

Desta forma, o sistema foi validado, pois a imagem pode ser observada com boa distinção, as várias ampliações foram mensuradas com precisão e a densidade celular obtida através do método por contagem interativa em nosso sistema possui um bom fator de correlação como o sistema comercial, ou seja, 90% de concordância de resultados (em torno de 40 córneas foram medidas).

## 6 - DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

O intuito deste projeto foi desenvolver um sistema de microscopia especular para Banco de Olhos que oferecesse, além da tradicional imagem do endotélio corneano magnificada de 160X, como os dos microscópios especulares existentes, várias magnificações do endotélio corneano “in vitro”. Esta propriedade adicional traz vários benefícios para análise do tecido endotelial, principalmente para a observação prévia, como um todo, desta camada, para se poder observar pregas no tecido retirado, *snail tracks*, vitalidade do tecido, etc. Aliás, através desta observação em menor magnificação, o pessoal do Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pode constatar a existência de células endoteliais vivas no *snail track*, até então acreditadas como mortas.

O projeto foi algo que veio amadurecendo seu desenvolvimento há 08 anos, com construções de sistemas para Lâmpada de Fenda, com projetos de lentes de magnificação até chegar ao estágio atual de um microscópio de várias magnificações para banco de olhos.

Através dos projetos óticos desenvolvidos e do protótipo montado em bancada, pôde-se constatar a qualidade dos resultados obtidos no que se refere às análises de aberrações do projeto ótico e das imagens obtidas das córneas analisadas.

Apesar do pouco número de córneas que foram avaliadas em nosso sistema e comparadas ao sistema comercial, é um indicador de sucesso para ser retirado da bancada e tornar-se um sistema de uso diário em Banco de Olhos, uma vez que os resultados estão em boa concordância com o sistema comercial.

A qualidade da imagem ainda é inferior ao do sistema comercial, mas a propriedade das variadas magnificações é um diferencial compensador para o sistema.

Desta forma a continuidade do sistema será em torná-lo portátil, e miniaturizá-lo, utilizando, por exemplo, um monitor pequeno, *software* gravado em EPROM, etc.

## **APÊNDICE I: AVALIAÇÃO DE SISTEMAS ÓPTICOS**<sup>(15-17)</sup>

Um sistema óptico livre de aberrações permite que para cada ponto de um objeto exista um único ponto equivalente na imagem, isto é, se o objeto for um plano normal ao eixo óptico sua imagem será outro plano normal ao eixo óptico e estará formada no plano focal paraxial.

Todos os cálculos da óptica geométrica, utilizados para projetar sistemas ópticos, estão baseados no princípio da teoria paraxial. Ao se calcular uma lente, leva-se em consideração apenas sua região paraxial, ou seja, a região central muito próxima do eixo óptico.

Na maioria das vezes, quando ao montar um sistema óptico, baseado apenas na teoria paraxial, deparar-se com imagens desfocadas e/ou distorcidas, estes defeitos são chamados de aberrações e elas acontecem quase sempre devido à diferença que existe entre a espessura da região central da lente e de sua borda.

A avaliação da qualidade dos sistemas ópticos é feita através da avaliação das aberrações apresentadas por este. Estas aberrações são classificadas em duas categorias, aberrações primárias (ou aberrações de Seidel) e aberrações cromáticas. As aberrações cromáticas são atribuídas aos defeitos na imagem causados pela relação que existe entre o índice de refração da lente e a frequência de cada cor do feixe de luz branca. As aberrações de Seidel são atribuídas aos defeitos causados na imagem devido ao uso de luz altamente monocromática, estas aberrações estão ainda subdivididas em:

- Aberração esférica
- Coma
- Astigmatismo
- Curvatura de Campo
- Distorção

### I.1 - ABERRAÇÃO CROMÁTICA

As lâmpadas incandescentes emitem radiação térmica a partir do superaquecimento do seu filamento metálico causado pela passagem de corrente elétrica. Esta radiação térmica é uma fonte de luz branca, que é a

porção visível do espectro da radiação eletromagnética. O comprimento de onda da luz branca varia do 390nm ao 780nm.

O índice de refração de um dado elemento óptico é dado por:

$$n = \frac{c}{v} \quad (I-1)$$

onde  $c$  é a velocidade da luz no vácuo e  $v$  é a velocidade da luz no meio, sendo

$$v = \frac{f}{\lambda} \quad (I-2)$$

onde  $f$  é a frequência da luz e  $\lambda$  seu comprimento de onda, podemos então escrever o índice de refração como sendo,

$$n = \frac{c\lambda}{f} \quad (I-3)$$

Através da equação acima nota-se que, o índice de refração de um elemento óptico varia com o comprimento de onda da luz.

Dado que a equação das lentes delgadas é dada por,

$$\frac{1}{F} = (n_l - 1) \left( \frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \quad (I-4)$$

e substituindo a equação (I-3) na equação (I-4) verifica-se que, o comprimento focal também irá variar com o comprimento de onda. Como o índice de refração decresce com o comprimento de onda da região do visível, então, o comprimento focal da lente aumenta com o comprimento de onda, como pode ser observado na Figura I-1.

**Figura I-1: Diagrama esquemático exemplificando a aberração cromática.**

A este tipo de comportamento da luz policromática dá-se o nome de aberração cromática. Uma lente com aberração cromática produz um conjunto de imagens distribuídas ao longo do eixo óptico que variam em tamanho e em cor, dando ao observador a sensação de vista borrada.

## I.2 – VARIAÇÃO ABERRACIONAL COM O DIÂMETRO DE ABERTURA E O CAMPO

Em todo sistema óptico há aberturas (também chamadas de *Stops*) que limitam a passagem de luz pelo sistema. Estas aberturas podem ser tanto os diâmetros das lentes quanto os diafragmas existentes no sistema. Uma destas aberturas, ou *stops*, determina o diâmetro do cone de luz axial que o sistema aceitará de um ponto qualquer no objeto. Esta abertura é chamada de *stop* de abertura e seu diâmetro determina a luminosidade da imagem. Outro *stop* importante no sistema é o que limita o tamanho da imagem, denominado *stop* de campo.

Tanto a aberração esférica quanto o coma são aberrações em que deve ser considerado o diâmetro de abertura de cada lente, afinal, a Aberração Esférica de uma lente é definida como sendo a variação do seu foco com sua abertura e o Coma é definido como sendo a variação da magnificação produzida pela lente com sua abertura. Nas Figuras I-2 e I-3 temos uma demonstração de como funcionam estes dois tipos de aberrações.

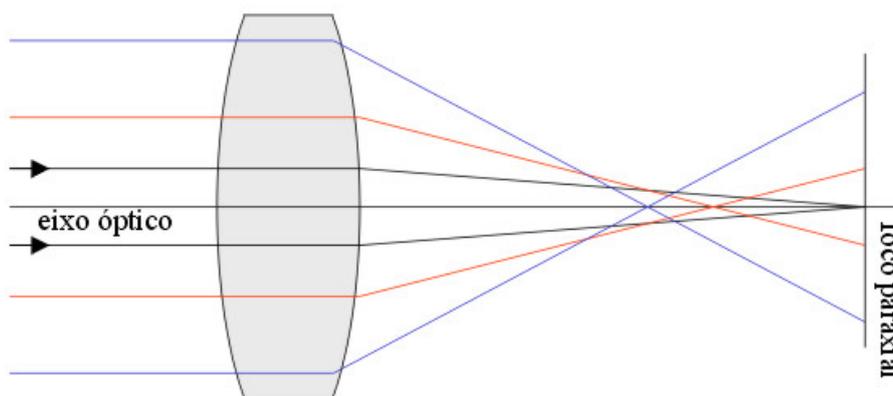
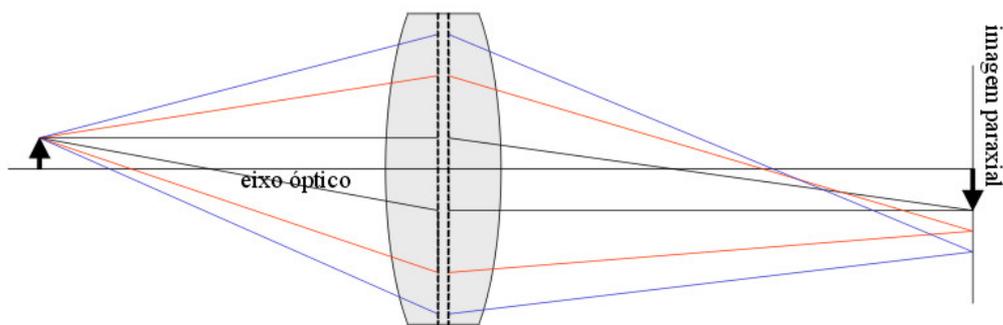


Figura I-2: Diagrama esquemático exemplificando a aberração esférica em termos de raios de luz, para um feixe monocromático (as cores são para distinguir os raios).

Na Figura I-2 é possível observar que os raios de luz de um feixe monocromático, que passam pela periferia de uma lente tendem a formar a imagem em um ponto focal anterior ao ponto focal paraxial formando, assim, a aberração esférica. Já na Figura I-3 é possível observar que, a imagem produzida pelos raios que passam pela periferia da lente tende a ter um tamanho diferente da imagem formada pelos raios paraxiais, neste exemplo é demonstrado um coma positivo, pois os raios marginais formam uma imagem maior que a imagem paraxial, porém existem também lentes que apresentam um coma negativo, isto é, apresentam uma imagem formada pelos raios marginais menor que a imagem formada pelos raios paraxiais.



**Figura I-3: Diagrama esquemático exemplificando o coma em termos de raios de luz.**

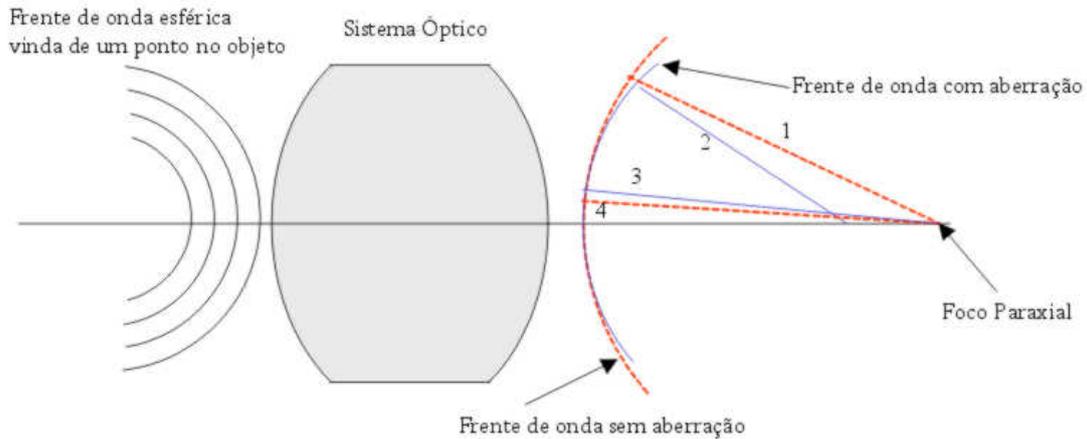
Para se eliminar as aberrações esféricas e comáticas de um sistema óptico é preciso levar em consideração não só o diâmetro de abertura de cada uma das lentes que compõe o sistema, mas também a posição de cada uma dentro do sistema e a posição de cada diafragma.

### I.3 – DIFERENÇA DE CAMINHO ÓPTICO

As aberrações também podem ser descritas em termos da natureza da onda eletromagnética. Pela teoria da óptica geométrica, as ondas eletromagnéticas que convergem para formar uma imagem perfeita possuem uma forma esférica. Assim, em um sistema óptico com aberrações, as ondas que convergem em um ponto da imagem estão deformadas da forma ideal, ou seja, não possuem a forma esférica.

Na presença de aberração esférica, a frente de onda possui suas extremidades mais curvadas, Figura I-4. Isto pode ser melhor entendido se nós

lembrarmos que um raio é o caminho de um ponto na frente de onda e também é normal à onda. Assim, se o raio cruzar o eixo óptico anteriormente ao foco paraxial, a seção da frente de onda associada ao raio deve ser mais curvada que o restante da onda.



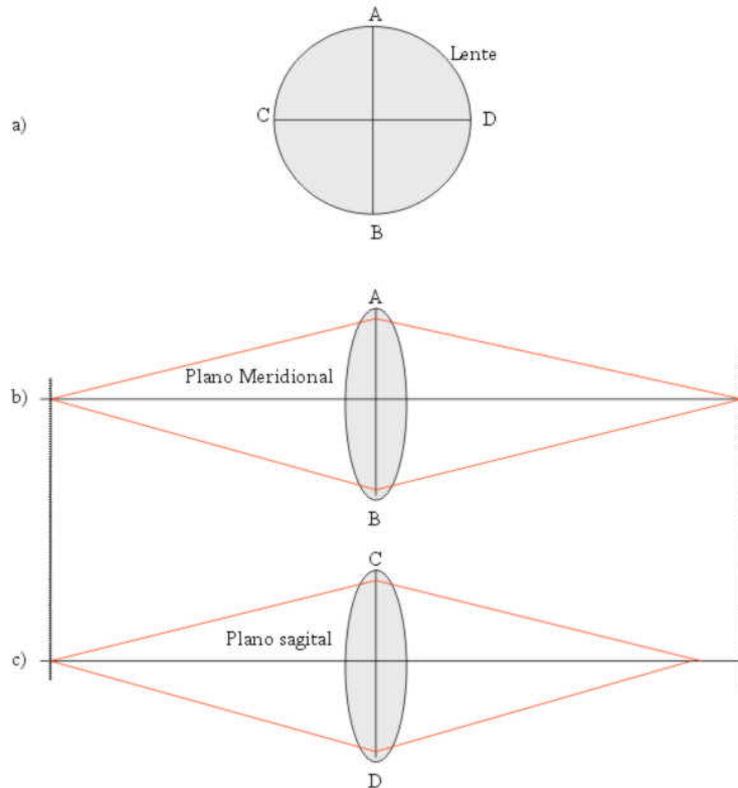
**Figura I-4: Diagrama esquemático exemplificando a aberração esférica, em termos de frentes de ondas e de raios de luz.**

Na Figura I-4 pode-se observar que os raios 1 e 3 provenientes das regiões periférica e paraxial, respectivamente, da frente de onda sem aberração, irão formar uma imagem perfeita no ponto focal paraxial, já os raios 2 e 4 provenientes das regiões periférica e paraxial, respectivamente, da frente de onda com aberração, formar-se-ão em pontos diferentes do eixo óptico; o raio 4 formará a imagem no ponto focal paraxial e o raio 2 formará a imagem em um ponto anterior ao ponto focal paraxial, caracterizando desta forma uma aberração esférica.

A porção periférica da frente de onda com aberração mostrada na Figura I-4 está à frente da porção periférica da frente de onda sem aberração, a distância entre estas duas regiões é chamada de diferença de caminho óptico ou O.P.D. (*Optical Path Difference*), e é expressa em unidades de comprimentos de onda.

São dois os tipos de aberrações que envolvem o O.P.D., são elas as aberrações axiais que produzem Figuras simétricas de rotação, como é o caso das aberrações esféricas, e as aberrações não axiais como é o caso do coma e do astigmatismo que não produzem Figuras simétricas de rotação.

Para entendermos como ocorre o astigmatismo devemos observar a Figura I-5.



**Figura I-5: Diagrama esquemático exemplificando o astigmatismo, em termos de raios de luz. a) visão frontal da lente com o segmento de reta AB que indica o corte meridional da lente e o segmento de reta CD que indica o corte sagital da lente. b) corte lateral da lente onde se observa o plano meridional. c) corte lateral da lente onde se observa o plano sagital.**

Na Figura I-5 podemos observar que os raios de luz pertencentes ao plano meridional (b) formarão a imagem em um ponto diferente dos raios que compõe o plano sagital (c). Tendo estas duas distâncias focais diferentes, o que obtém-se é uma imagem deformada. Esta deformação é denominada *astigmatismo*. Na presença do astigmatismo, a imagem de uma fonte pontual não é um ponto, mas sim um borrão elíptico ou circular.

O astigmatismo de uma lente está em função de seu formato e da sua distância às aberturas ou diafragmas que limitam a quantidade de luz que a atravessa.

#### I.4 – TOLERÂNCIA ABERRACIONAL

Por menor que seja a aberração em um sistema óptico, sempre existe uma degradação da qualidade da imagem, e por melhor que tenha sido projetado e desenvolvido este sistema, ele sempre apresentará um nível mínimo de aberração. O que faremos aqui é estabelecer um nível tolerável de aberração, para isso, é necessário, antes, estabelecer um limite mínimo de desempenho que o sistema deve ter.

O limite mínimo de desempenho que um sistema óptico possui é estabelecido por um padrão de difração, resultado do diâmetro de abertura do sistema. Considere um sistema óptico que produz as imagens de duas fontes pontuais de luz e de intensidades iguais. A imagem de cada ponto é um disco circular de luz, se os pontos forem muito próximos os padrões de difração irão se sobrepor. Quando há uma separação considerável entre estes padrões, de forma a permitir a determinação da existência dos dois pontos, dizemos que os pontos são solucionáveis. Na Figura I-6 pode-se verificar, através dos padrões de difração, quando os pontos são solucionáveis ou não.

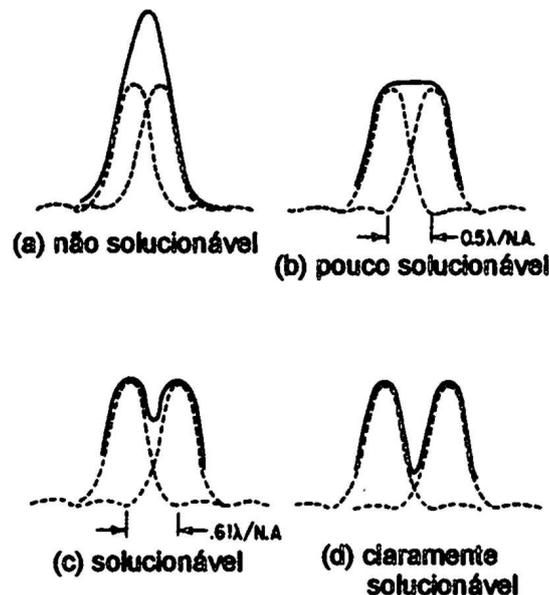
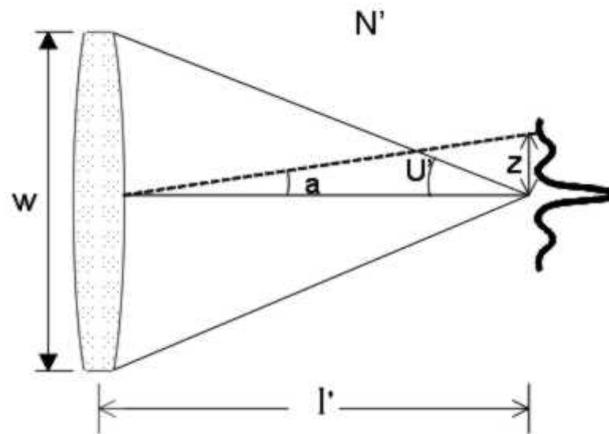


Figura I-6: Representação esquemática de dois padrões de difração referentes as imagens de dois pontos luminosos.

Quando as imagens dos dois pontos luminosos distam menos do que  $0.5\lambda/N.A.$  (onde  $N.A.$  é a abertura numérica do sistema e  $N.A. = N'\sin U'$ , sendo  $N'$  e  $U'$  indicados na Figura I-7), os máximos centrais de ambos os

padrões de difração misturam-se, formando um padrão combinado que aparenta ser devido a uma única fonte - Figura I-6 (a). Quando a separação das imagens atinge  $0.61\lambda/N.A.$ , Figura I-6 (c), ocorre uma indicação clara de dois máximos separados, este valor permite dizer que os dois pontos são solucionáveis e é chamado de critério de *Lord Rayleigh*<sup>(15)</sup>, sendo este valor amplamente utilizado para achar o limite mínimo de desempenho de um sistema óptico.

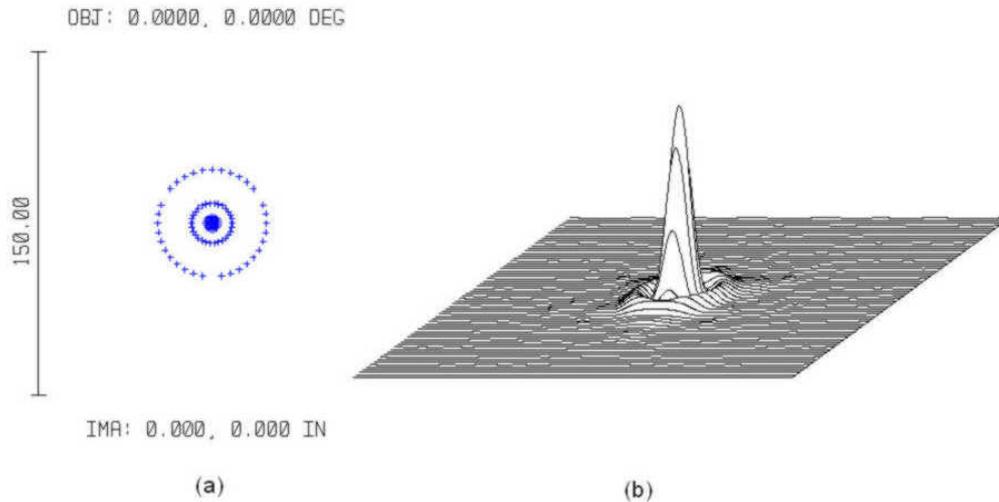


**Figura I-7: Representação esquemática de um sistema óptico produzindo uma imagem devido a uma única fonte pontual.**

Assim podemos dizer que o limite de resolução de um sistema é proporcional ao comprimento de onda e inversamente proporcional à abertura do sistema, ou seja, o limite de resolução melhora ao reduzirmos o comprimento de onda ou ao aumentarmos a abertura do sistema.

Para se obter uma imagem perfeita, o Critério de Rayleigh não permite mais que um quarto de comprimento de onda de O.P.D., em uma frente de onda, quando relacionada com uma referência esférica. Por conveniência, será usado o termo *Rayleigh Limit*, que significa um quarto de comprimento de onda de O.P.D.

A imagem formada por uma lente ótima produz um padrão de difração, Figura I-8, que contém 84% de sua energia concentrada em um disco central, os 16% restantes estão distribuído nos anéis restantes.



**Figura I-8: (a) Padrão de difração produzido por uma lente ótima, (b) Distribuição de energia no disco central e anéis subsequentes.**

A seguir temos as quantidades de aberrações que correspondem a um *Rayleigh Limit* (O.P.D. =  $\lambda/4$ ).

$$\text{Fora de Foco} = \pm \frac{\lambda}{2N\sin^2 U_m} \quad (I-5)$$

$$\text{Aberração Esférica Marginal} = \pm \frac{4\lambda}{N\sin^2 U_m} \quad (I-6)$$

$$\text{Aberração Esférica Zonal} = \pm \frac{6\lambda}{N\sin^2 U_m} \quad (I-7)$$

$$\text{Coma Sagital} = \pm \frac{\lambda}{N\sin^2 U_m} \quad (I-8)$$

$$\text{O.S.C.} = \pm \frac{\lambda}{2NH\sin U_m} \quad (I-9)$$

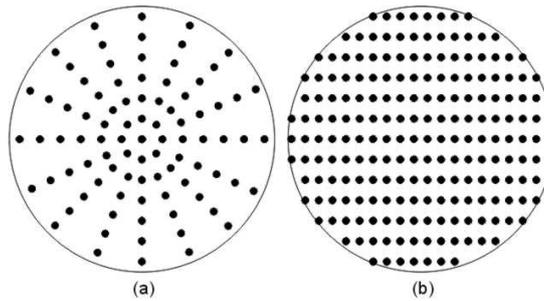
$$\text{Aberração Cromática Axial} = \pm \frac{\lambda}{N\sin^2 U_m} \quad (I-10)$$

Onde  $\lambda$  é o comprimento de onda de luz utilizada no sistema óptico, N é o índice do meio no qual a imagem é formada,  $U_m$  é o ângulo entre o raio marginal e o raio axial que forma a imagem, H é a altura da imagem.

#### I.5 – DISTRIBUIÇÃO GEOMÉTRICA DE ENERGIA NA IMAGEM

Quando as aberrações excedem o Limite de Rayleigh por várias vezes, pode-se utilizar os resultados do método “*Geometrical Ray Tracing*”, para

prever o aspecto de uma imagem pontual com um alto grau de precisão. Isto é feito dividindo a pupila de entrada do sistema óptico em um grande número de pequenas regiões de áreas iguais e, passando um raio que vem de um mesmo ponto do objeto pelo centro de cada uma destas pequenas regiões. A Figura I-9 indica os dois métodos utilizados para localizar os pontos na pupila de entrada por onde os raios irão passar.



**Figura I-9: Representação de como é feita a divisão em áreas iguais de uma pupila, onde cada ponto nas Figuras indica o local em que cada raio proveniente do mesmo ponto no objeto deverá passar. (a) Distribuição Polar. (b) Distribuição retangular.**

A interseção de cada raio, que atravessa a pupila de entrada, com o plano da imagem é mapeado, sendo cada ponto no mapa uma representação de uma fração da energia total na imagem onde os pontos possuem o mesmo valor fracionado de energia, a densidade dos pontos no mapa é uma medida da densidade de energia na imagem. Obviamente, quanto mais raios são traçados, mais precisa é a representação geométrica da imagem. Este tipo de mapa é chamado de diagrama de spot.

Todos diagramas de spot utilizados aqui para avaliação do microscópio especular foram preparados pelo *software* de desenho óptico “*ZEMAX-XE: optical design Program*”. A Figura I-10 demonstra os diagramas de spot de um exemplo de projeto óptico (Figura I-11) do *software* em questão.

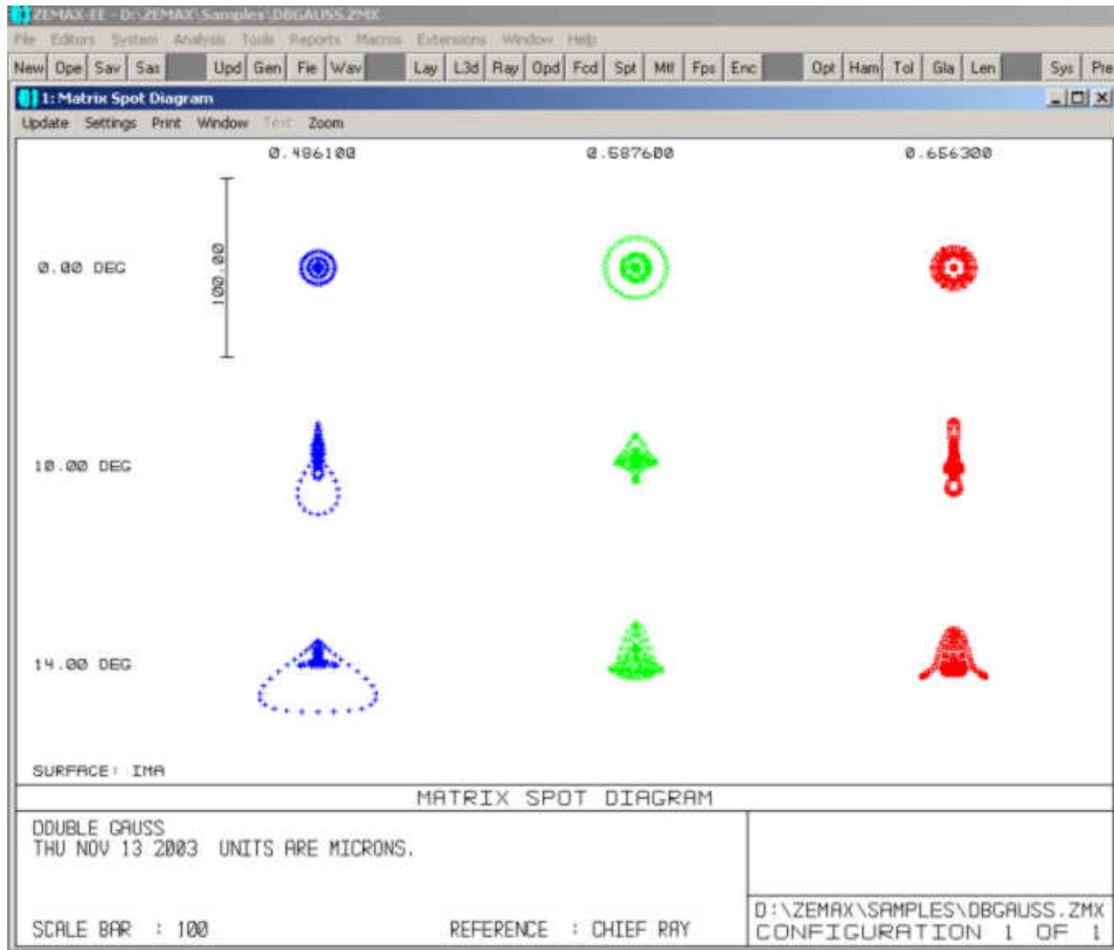


Figura I-10: Diagrama de Spot do projeto óptico de um Dupleto Gaussiano do “ZEMAX-XE: optical design Program”.

GENERAL LENS DATA:	
Surfaces	12
Stop	6
System Aperture	Entrance Pupil Diameter = 33.33
Glass Catalogs	schott
Ray Aiming	Off
Apodization	Uniform, factor = 0.00000E+000
Effective Focal Length	99.50068 (in air at system temperature and pressure)
Effective Focal Length	99.50068 (in image space)
Back Focal Length	57.49797
Total Track	132.9884
Image Space F/#	2.985319
Paraxial Working F/#	2.985319
Working F/#	2.978283
Image Space NA	0.1651855
Object Space NA	1.6665e-009
Stop Radius	9.996598
Paraxial Image Height	24.80831
Paraxial Magnification	0
Entrance Pupil Diameter	33.33
Entrance Pupil Position	58.93976
Exit Pupil Diameter	36.25844
Exit Pupil Position	-108.0596
Field Type	Angle in degrees
Maximum Field	14
Primary Wave	0.5876
Lens Units	Millimeters
Angular Magnification	0.9192343

SURFACE DATA SUMMARY:						
Surf	Type	Comment	Radius	Thickness	Glass	Diameter
OBJ	STANDARD		Infinity	Infinity		0
1	STANDARD		54.15325	8.746658	SK2	58.4506
2	STANDARD		152.5219	0.5		56.28191
3	STANDARD		35.95062	14	SK16	48.59162
4	STANDARD		Infinity	3.776966	F5	42.59438
5	STANDARD		22.26992	14.25306		29.83871
STO	STANDARD		Infinity	12.42813		20.45767
7	STANDARD		-25.68503	3.776966	F5	26.37552
8	STANDARD		Infinity	10.83393	SK16	32.93624
9	STANDARD		-36.98022	0.5		37.85914
10	STANDARD		196.4173	6.858175	SK16	42.62153
11	STANDARD		-67.14755	57.31454		43.29252
IMA	STANDARD		Infinity			49.14107

Figura I-11: Projeto óptico de um Dupleto Gaussiânico do “ZEMAX-XE: optical design Program”.

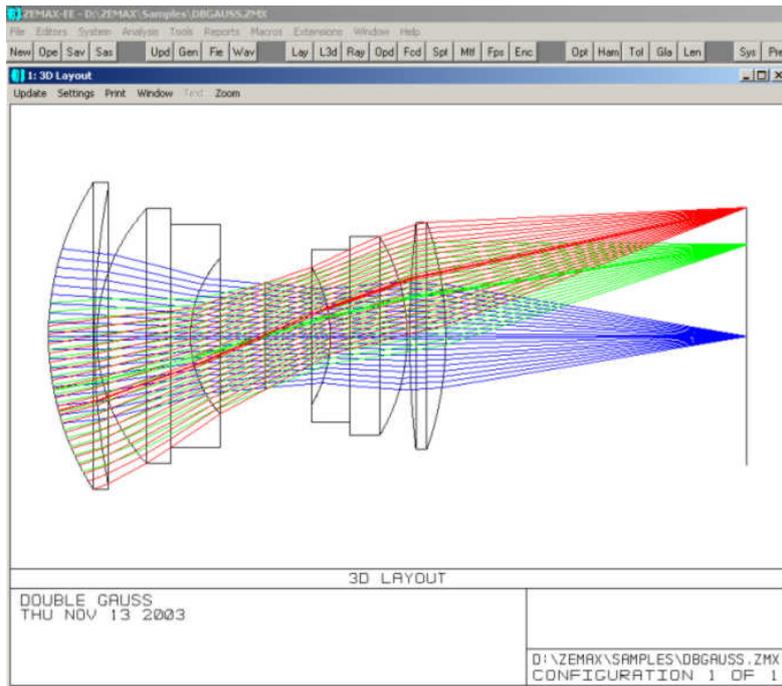


Figura I-12: Desenho esquemático do Projeto óptico de um Dupleto Gaussiano do “ZEMAX-XE: optical design Program”.

O diagrama de spot de uma imagem também pode ser visualizado tridimensionalmente e seu aspecto é o de uma montanha de energia, como pode ser observado na Figura I-13.

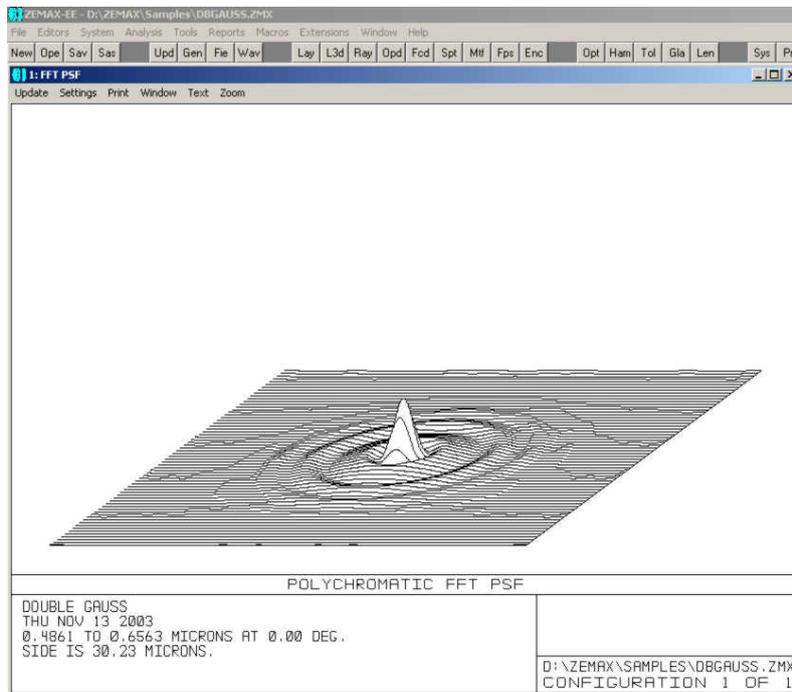
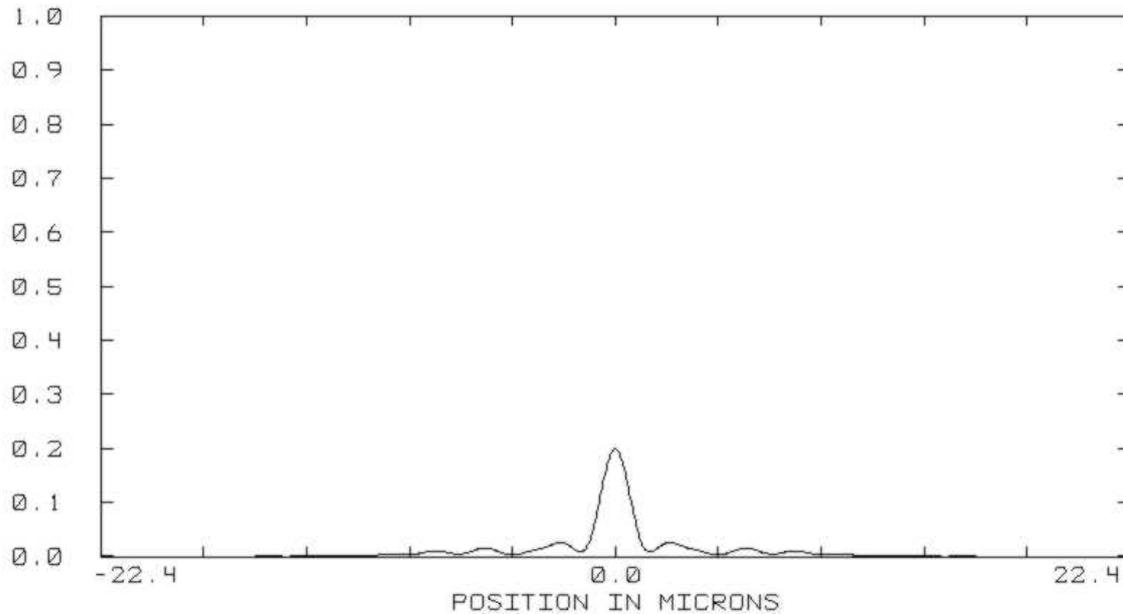


Figura I-13: Projeto óptico de um Dupleto Gaussiano do “ZEMAX-XE: optical design Program”. Distribuição de energia em uma imagem de um ponto do objeto.

Na Figura I-13 observa-se a distribuição de energia na imagem de um objeto pontual, a partir desta distribuição de energia, pode-se subtrair a função de espalhamento pontual da imagem. A função de espalhamento é obtida através de uma seção transversal do sólido de distribuição da energia, seu aspecto pode ser observado na Figura I-14.



**Figura I-14: Projeto óptico de um Dupleto Gaussiano do “ZEMAX-XE: optical design Program”. Função de espalhamento pontual da imagem (PSF).**

#### I.6 – AVALIAÇÕES FEITAS PELO ZEMAX OPTICAL DESIGN PROGRAM <sup>(32)</sup>

Quando se projeta um sistema ótico no *software* ZEMAX, várias análises são apresentadas por ele, que são avaliações do projeto concebido. São elas:

**Ray Fan** - Demonstra as aberrações de raio que ocorrem em função das coordenadas x e y da pupila do sistema.

**OPD Fan** - Demonstra a diferença de caminho óptico como uma função das coordenadas x e y da Pupila.

**Pupil Aberration Fan** - Demonstra a distorção causada pela pupila de entrada como uma função de suas coordenadas x e y.

**Spot Diagram** - Demonstra o diagrama do Spot, através dele é possível avaliar as aberrações da imagem, principalmente a aberração esférica que é avaliada pelo tamanho do spot, e o astigmatismo que é avaliado pelo aspecto circular do diagrama.

**Through Focus Spot Diagram** - Demonstra como os spots mudam com a variação de posição dos planos focais.

**FFT PSF** – Calcula a função de espalhamento pontual usando o método FFT, permitindo observar a distribuição de energia da imagem.

**Geometric Image Analysis** – Simula uma imagem produzida pelo sistema óptico.

Baseado nestas informações obtidas, o usuário tem noção dos componentes a serem aprimorados em seu projeto.

## APÊNDICE II: DETALHAMENTO DOS PROJETOS ÓPTICOS DO MICROSCÓPIO ESPECULAR

Estes apêndice traz as tabelas do dados dos componentes óticos, que compuseram o sistema de microscopia especular desta dissertação (vide capítulo 4).

O sistema de iluminação é formado pelos seguintes componentes óticos: 01 lâmpada, 01 lente condensadora, 01 lente de projeção, 01 diafragma, 01 fenda retangular com largura variável e 01 fenda circular com diâmetro variável.

**Tabela II.1: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de iluminação.**

SUPERFÍCIE	CARACTERÍSTICAS	
OBJ	PADRÃO	
STO	PADRÃO	
2	PADRÃO	
3	PADRÃO - DIAFRAGMA CIRCULAR VARIÁVEL	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	5
4	PADRÃO - DIAFRAGMA RETANGULAR VARIÁVEL	
	Abertura	Rectangular Abertura
	Largura média em X	0.5
	Largura media em Y	5
5	PADRÃO	
6	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
7	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	12.5
	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0

8	Inclinação em Z	0
9	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	12.82008
10	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	12.75747
11	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	12.73704
12	PADRÃO	
13	COORDBRK	
	Inclinação em X	-45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
14	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	12.5
15	COORDBRK	
	Inclinação em X	-45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
IMA	PADRÃO	

Os sistema de magnificação de 20x, 40x, 136x e 204x são formados pelos seguintes componentes ópticos: 1 lente objetiva, 1 telescópio galileano formado por 2 dubletos (lente composta por dois índices de refração diferentes e 3 raios de curvatura), 1 diafragma, 1 telescópio de lentes eretoras formado por 1 lente, 6 dubletos, 1 triplete (lente composta por três índices de refração e 4 raios de curvatura), e 1 prisma.

O sistema de magnificação de 63x é formados pelos seguintes componentes ópticos: 1 lente objetiva, 1 diafragma, 1 telescópio de lentes eretoras formado por 1 lente, 6 dubletos, 1 triplete (lente composta por três índices de refração e 4 raios de curvatura), e 1 prisma.

**Tabela II.2: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de ampliação de 20x.**

<b>SUPERFÍCIE</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	
OBJ	PADRÃO	
STO	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	18.5
2	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	18.5
3	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	4.3
4	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
5	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	4.3
6	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	7.3
7	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	7.5
8	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	7.5
9	PADRÃO - DIAFRAGMA	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0

	Raio Máximo	4.1
10	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
11	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
12	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
13	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
14	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
15	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
16	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
17	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
18	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
19	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
20	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10

21	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
22	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
23	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
24	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
25	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
26	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
27	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
28	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
29	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
30	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
	PADRÃO	

31	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
32	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
33	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
34	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
35	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
36	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
37	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
38	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
39	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
40	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
IMA	PADRÃO	

**Tabela II.3: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de ampliação de 30x.**

<b>SUPERFÍCIE</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	
OBJ	PADRÃO	
STO	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	18.5
2	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	18.5
3	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	7.3
4	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	7.5
5	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	7.3
6	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	5.5
7	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	6
8	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	5.5
9	PADRÃO - DIAFRAGMA	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0

	Raio Máximo	3.6
10	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
11	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
12	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
13	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
14	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
15	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
16	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
17	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
18	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
19	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
20	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10

21	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
22	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
23	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
24	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
25	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
26	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
27	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
28	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
29	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
30	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
	PADRÃO	

31	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
32	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
33	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
34	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
35	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
36	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
37	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
38	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
39	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
40	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
IMA	PADRÃO	

**Tabela II.4: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de ampliação de 63x.**

<b>SUPERFÍCIE</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	
OBJ	PADRÃO	
1	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	18.5
2	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	18.5
3	PADRÃO – DIAFRAGMA	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	7
4	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
5	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
6	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
7	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
8	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
9	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
10	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5

STO	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
12	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
13	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
14	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
15	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
16	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
17	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
18	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
19	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
20	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
	PADRÃO	

21	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
22	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
23	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
24	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
25	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
26	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
27	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
28	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
29	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
30	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
31	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
	PADRÃO	

32	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
33	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
34	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
IMA	PADRÃO	

**Tabela II.5: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de ampliação de 136x.**

<b>SUPERFÍCIE</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	
OBJ	PADRÃO	
STO	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Máximo	18.5
2	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	18.5
3	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	7.5
4	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	7.5
5	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	7.5
6	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	6
7	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	6

8	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	6
9	PADRÃO - DIAFRAGMA	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
10	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
11	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
12	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
13	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
14	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
15	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
16	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
17	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
18	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10

19	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
20	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
21	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
22	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
23	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
24	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
25	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
26	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
27	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
28	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
	PADRÃO	

29	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
30	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
31	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
32	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
33	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
34	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
35	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
36	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
37	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
38	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
39	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
	PADRÃO	

40	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
IMA	PADRÃO	

**Tabela II.6: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de ampliação de 205x.**

SUPERFÍCIE	CARACTERÍSTICAS	
OBJ	PADRÃO	
STO	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	18.5
2	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	18.5
3	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	7.0
4	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	7.5
5	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Máximo	7.0
6	PADRÃO	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	4
7	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
8	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4

9	PADRÃO - DIAFRAGMA	
	Abertura	Abertura circular
	Raio Mínimo	0
	Raio Máximo	0.39
10	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
11	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
12	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
13	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
14	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
15	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
16	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
17	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
18	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
19	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10

20	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
21	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
22	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
23	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	4.5
24	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
25	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
26	COORDBRK	
	Inclinação em X	45
	Inclinação em Y	0
	Inclinação em Z	0
27	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
28	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
29	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
	PADRÃO	

30	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
31	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
32	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
33	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
34	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
35	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
36	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
37	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
38	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
39	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
40	PADRÃO	
	Abertura	Abertura fixa
	Raio Máximo	10
IMA	PADRÃO	

## APÊNDICE III: COMPRIMENTO DE ONDA E VIDROS UTILIZADOS NOS SISTEMAS ÓPTICOS DO MICROSCÓPIO ESPECULAR

Neste apêndice estão descritos em detalhes os vidros utilizados na confecção das lentes projetadas e o comprimento de onda utilizado.

**Tabela III.1: Comprimento de onda utilizado para os cálculos dos sistemas de amplificação do Microscópio Especular.**

Quantidade de comprimento de onda utilizado	2
Unidade de medida	Mícron
1 - Comprimento de onda utilizado	0.587562

**Tabela III.2: Vidros e seus respectivos índices de refração utilizados nos sistemas de amplificação do Microscópio Especular.**

Comprimentos de onda 0.587562

<b>VIDRO</b>	<b>Índice de Refração</b>
BK7	1.51680003
BASF2	1.66446033
FK3	1.46449998
LAF22A	1.78179059
FK5	1.48749000
K10	1.50137098
F1	1.62588231
F6	1.63635885

## APENDICE IV: AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS DE MAGNIFICAÇÃO DO MICROSCÓPIO ESPECULAR

### IV.1 - SISTEMA DE MAGNIFICAÇÃO DE 20X

#### IV.1.1 – AVALIAÇÃO DE ABERRAÇÕES

Podemos observar na Figura IV-1 as aberrações de raio que ocorrem em função das coordenadas x e y da pupila do sistema de magnificação de 20x, como ilustrado pelo gráfico, esta aberração possui um valor inferior a  $500\mu\text{m}$ . Na Figura IV-2 observamos a diferença de caminho óptico que ocorre em função das coordenadas x e y da pupila do sistema de magnificação de 20x, como ilustrado pelo gráfico a diferença de caminho óptico possui um valor inferior a 0.1 unidade de onda. Na Figura IV-3 observamos as distorções que ocorrem na imagem como função das coordenadas da pupila de entrada do sistema de magnificação de 20x, como ilustrado pelo gráfico estas distorções possuem um valor inferior a 0.01%.

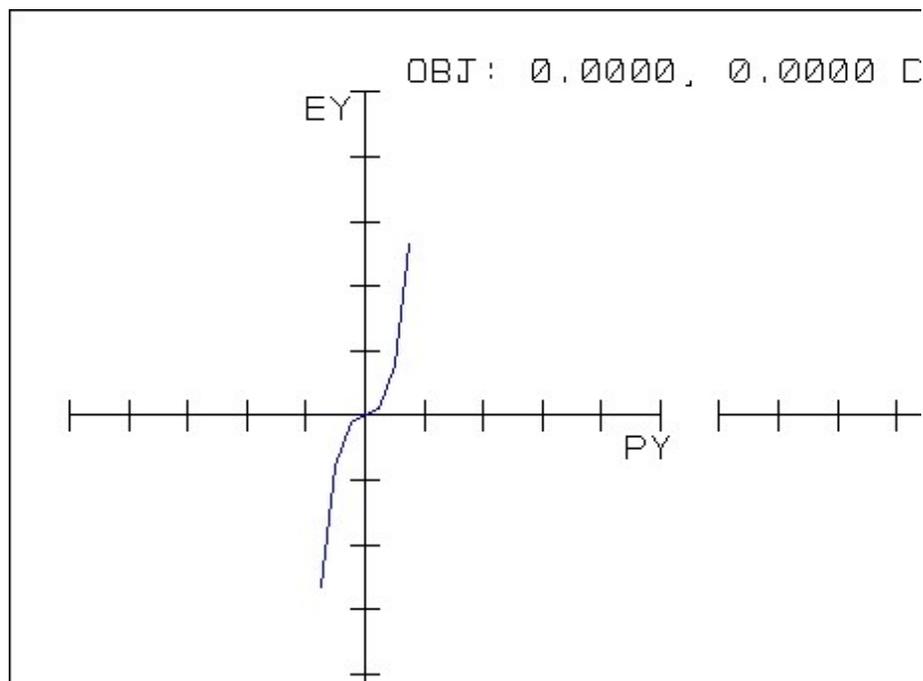


Figura IV-1: *Aberração de Raio* do Sistema Óptico para Magnificação de 20x do M.E.

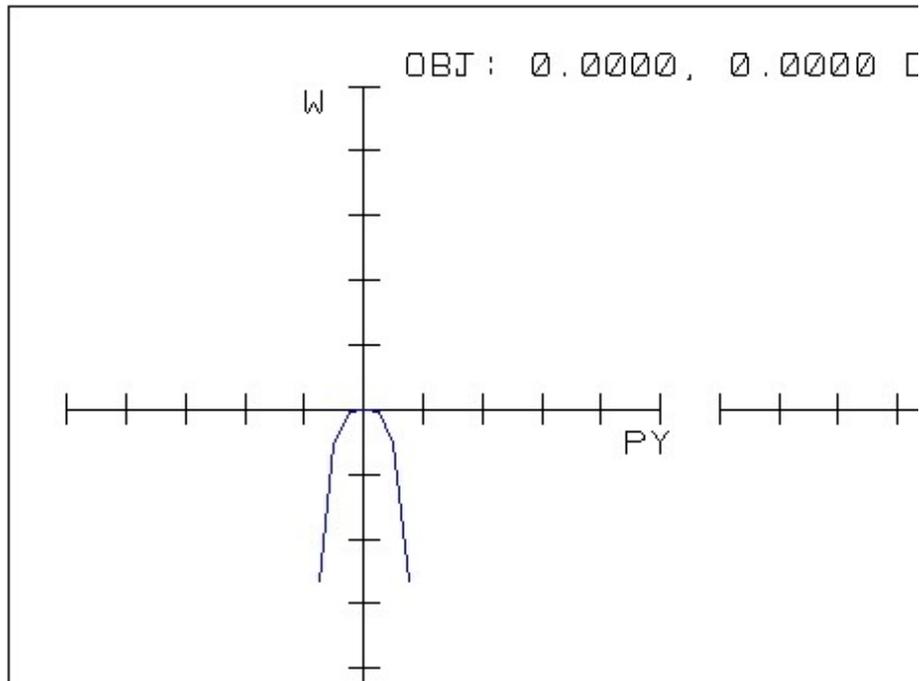


Figura IV-2: Diferença de caminho óptico do Sistema Óptico para Magnificação de 20x do M.E.

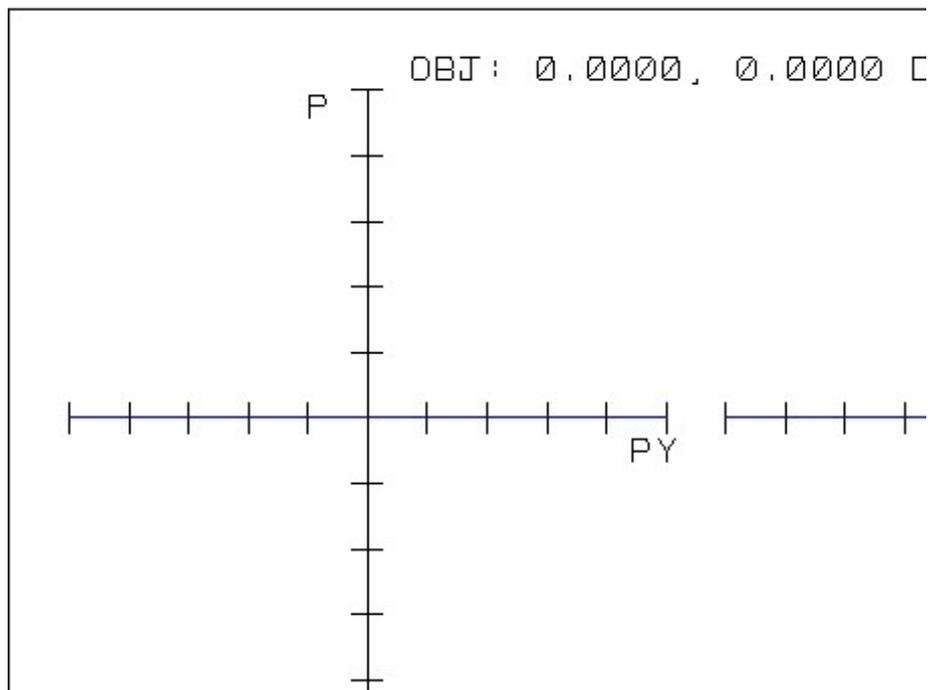


FIGURA IV-3: Aberração da Pupila de Entrada do Sistema Óptico para Magnificação de 20x do M.E.

#### IV.1.2 – AVALIAÇÃO POR DIAGRAMAS DE SPOTS

Nas Figuras IV-4 e IV-5 podemos avaliar as aberrações do sistema de magnificação de 20x através do diagrama de *spot*. Na Figura IV-4 observamos

que o diagrama apresenta um raio do spot que tende a  $0 \mu\text{m}$ , isto indica que, apesar das aberrações mostradas pelas Figuras IV-1, IV-2, e IV-3, o sistema não apresenta problemas na formação de imagens. Na Figura IV-5 podemos observar que a variação do diâmetro do spot com a variação do plano focal é inexistente pois o raio do spot se mantêm a  $0 \mu\text{m}$  para qualquer posição.

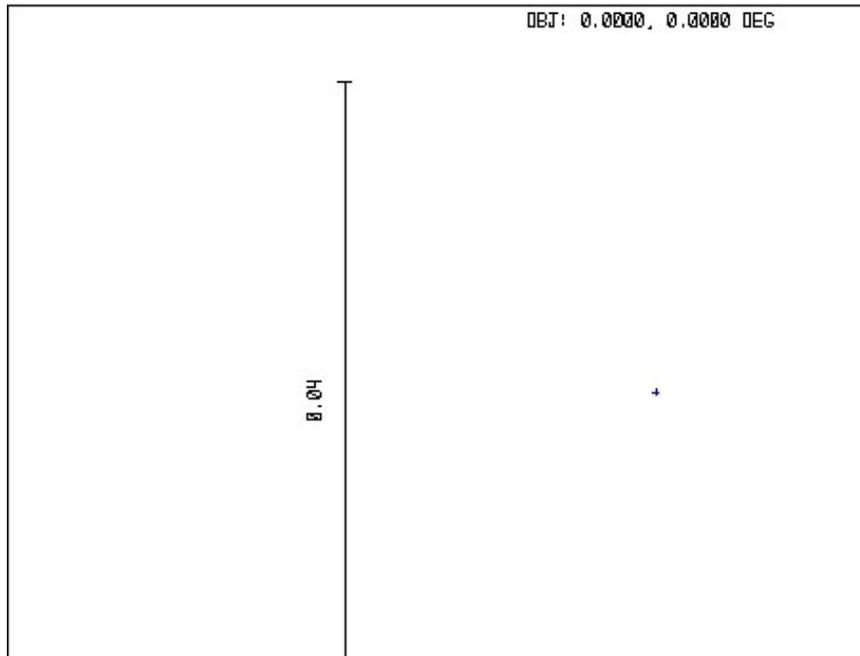


Figura IV-4: Diagrama de Spot do Sistema para Magnificação de 20x do M.E.

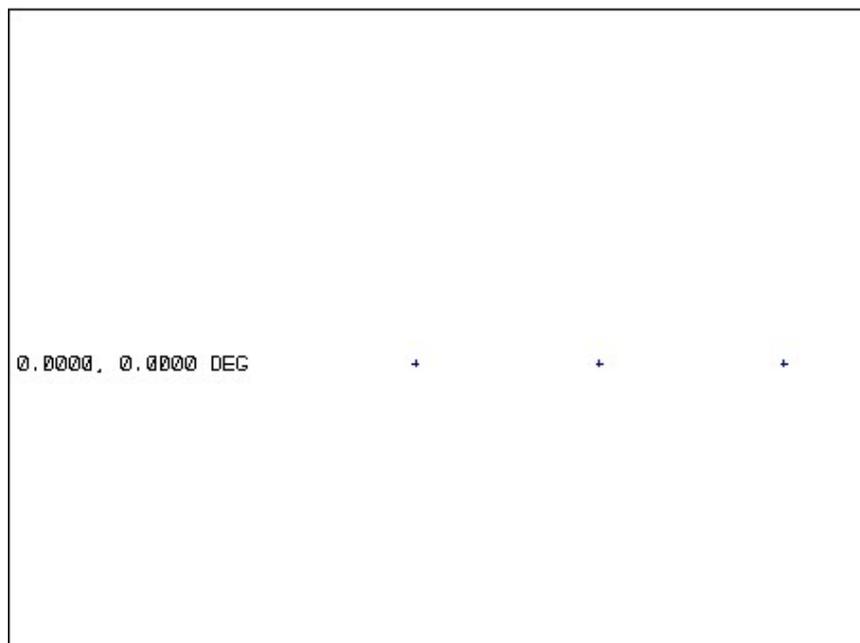
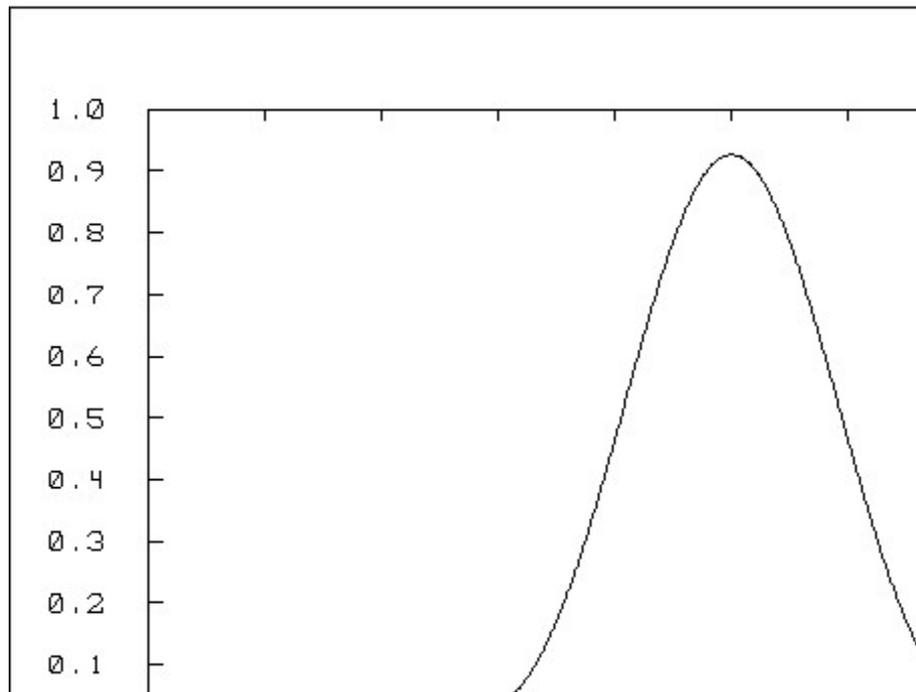


Figura IV-5: Variação do Diagrama de Spot com a Variação do Plano Focal da Imagem do Sistema para Magnificação de 20x do M.E.

#### IV.1.3 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ENERGIA NA IMAGEM

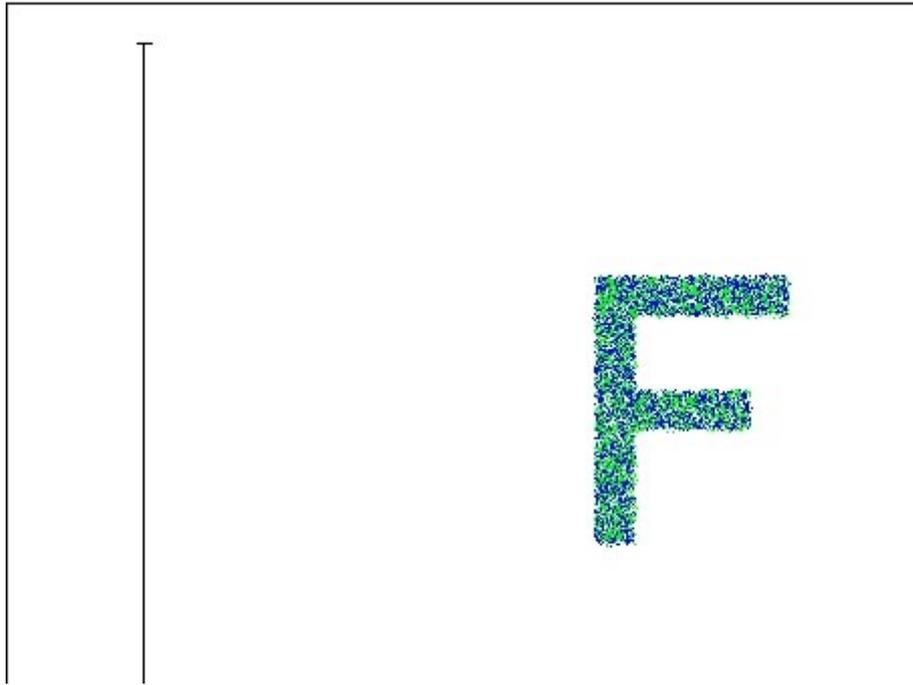
Na Figura IV-6 temos uma seção transversal do sólido de distribuição da energia calculado a partir de um algoritmo FFT, nele podemos observar que a maior parte da energia se concentra no pico central o que nos leva a afirmar que o sistema possui um ótimo padrão de difração, uma vez que um sistema ótimo possui em torno de 84% de energia no pico central (ver apêndice I).



**Figura IV-6: Seção Transversal da Função de Espalhamento Pontual do Sistema para Magnificação de 20x do M.E.**

#### IV.1.4 – AVALIAÇÃO DA IMAGEM

Na Figura IV-7 temos a simulação da imagem de uma letra que seria produzida pelo sistema de magnificação de 20x do M.E., através dela podemos ver o quanto a imagem esta nítida e livre de aberrações.



**Figura IV-7: Simulação da imagem produzida pelo Sistema para Magnificação de 20x do M.E.**

## IV.2 - SISTEMA DE MAGNIFICAÇÃO DE 30X

### IV.2.1 – AVALIAÇÃO DE ABERRAÇÕES

Podemos observar na Figura IV-8 as aberrações de raio que ocorrem em função das coordenadas  $x$  e  $y$  da pupila do sistema de magnificação de 30x, como ilustrado pelo gráfico, esta aberração possui um valor inferior a  $500\mu\text{m}$ . Na Figura IV-9 observamos a diferença de caminho óptico que ocorre em função das coordenadas  $x$  e  $y$  da pupila do sistema de magnificação de 30x, como ilustrado pelo gráfico a diferença de caminho óptico possui um valor inferior a 0.05 unidade de onda. Na Figura IV-10 observamos as distorções que ocorrem na imagem como função das coordenadas da pupila de entrada do sistema de magnificação de 30x, como ilustrado pelo gráfico estas distorções possuem um valor inferior a 0.01%.

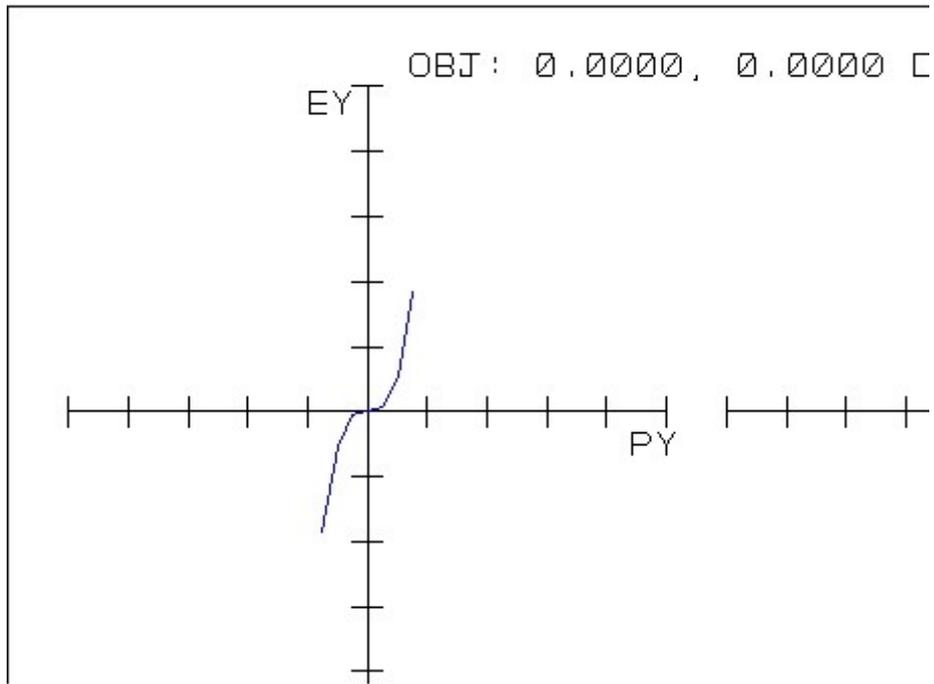


FIGURA IV-8: Aberração de Raio do Sistema Óptico para Magnificação de 30x do M.E.

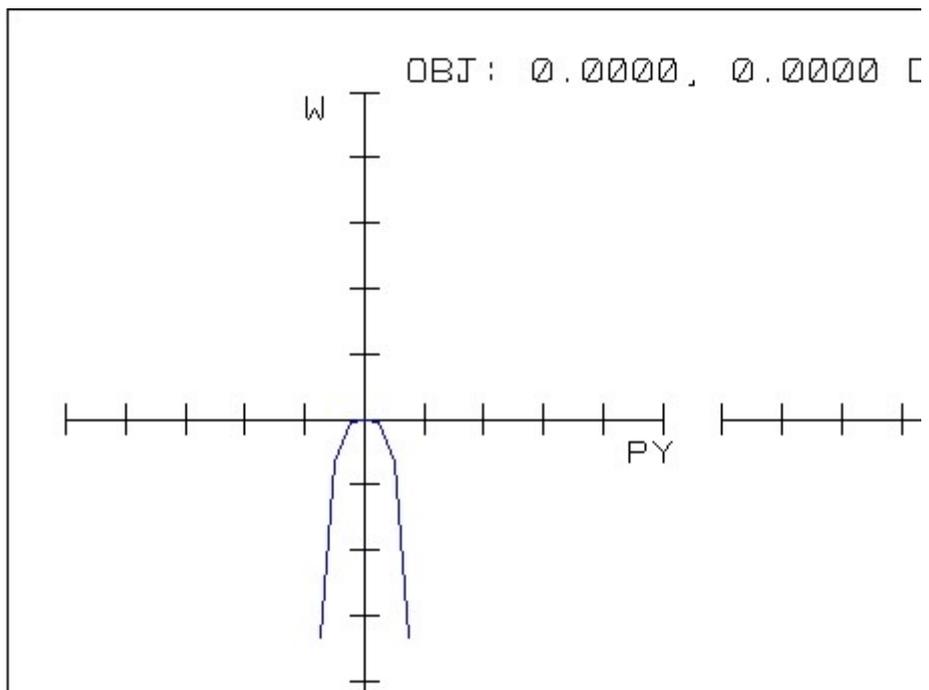
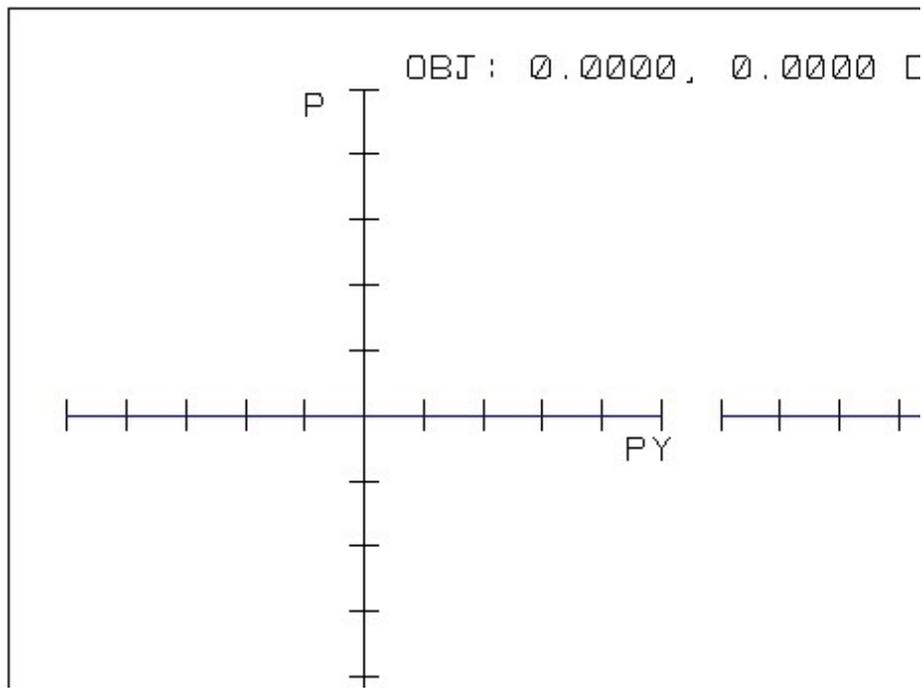


FIGURA IV-9: Diferença de caminho optico do Sistema Óptico para Magnificação de 30x do M.E.



**FIGURA IV-10: Aberração da Pupila de Entrada do Sistema Óptico para Magnificação de 30x do M.E.**

#### IV.2.2 – AVALIAÇÃO POR DIAGRAMAS DE SPOTS

Nas Figuras IV-11 e IV-12 podemos avaliar as aberrações do sistema de magnificação de 30x através do diagrama de *spot*. Na Figura IV-11 observamos que o diagrama apresenta um raio do spot que tende a 0  $\mu\text{m}$ , isto indica que, apesar das aberrações mostradas pelas Figuras IV-8, IV-9, e IV-10, o sistema não apresenta problemas na formação de imagens. Na Figura IV-12 podemos observar que a variação do diâmetro do spot com a variação do plano focal é inexistente pois o raio do spot se mantém a 0  $\mu\text{m}$  para qualquer posição.

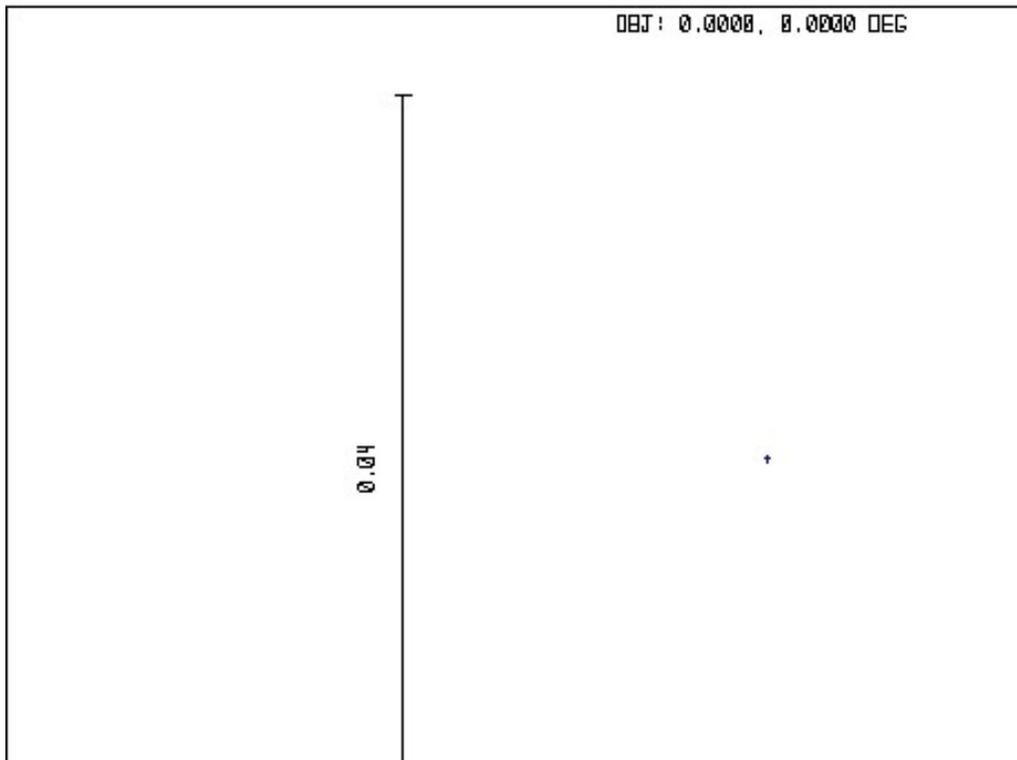


Figura IV-11: Diagrama de Spot do Sistema para Magnificação de 30x do M.E.

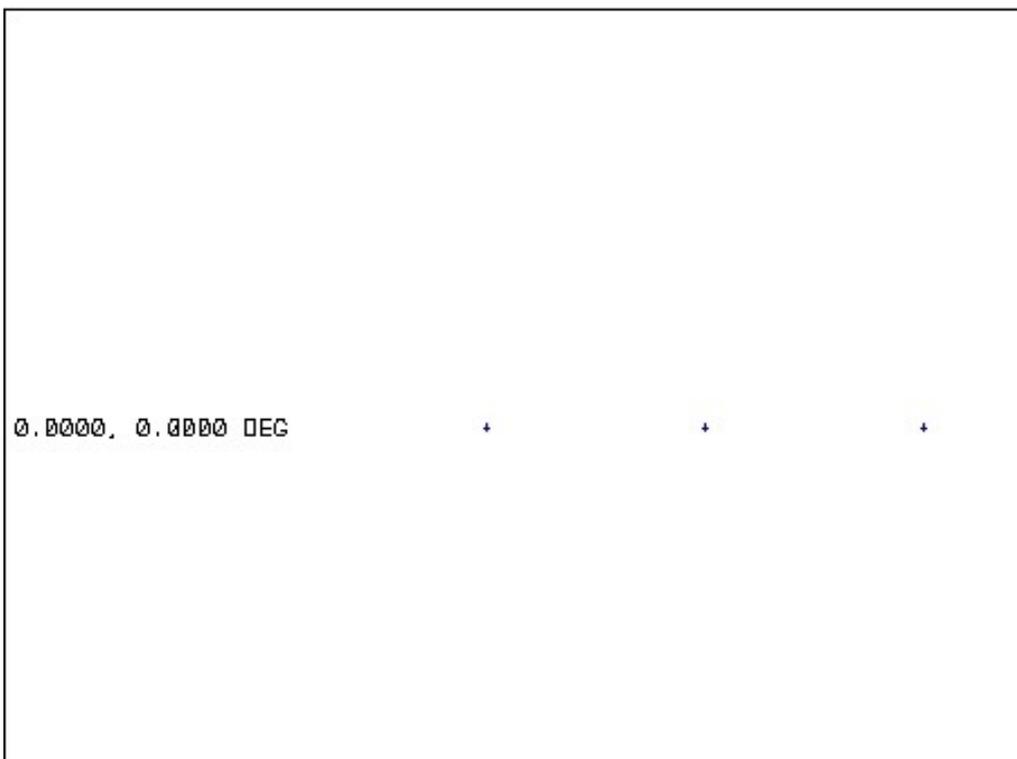
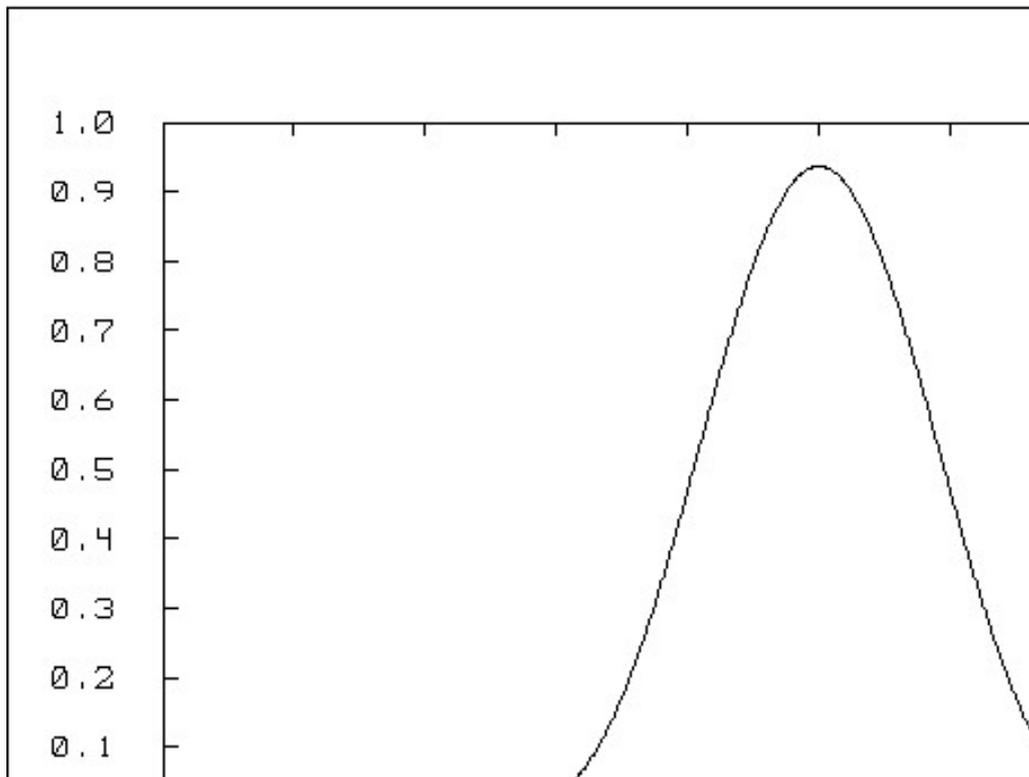


Figura IV-12: Variação do Diagrama de Spot com a Variação do Plano Focal da Imagem do Sistema para Magnificação de 30x do M.

#### IV.2.3 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ENERGIA NA IMAGEM

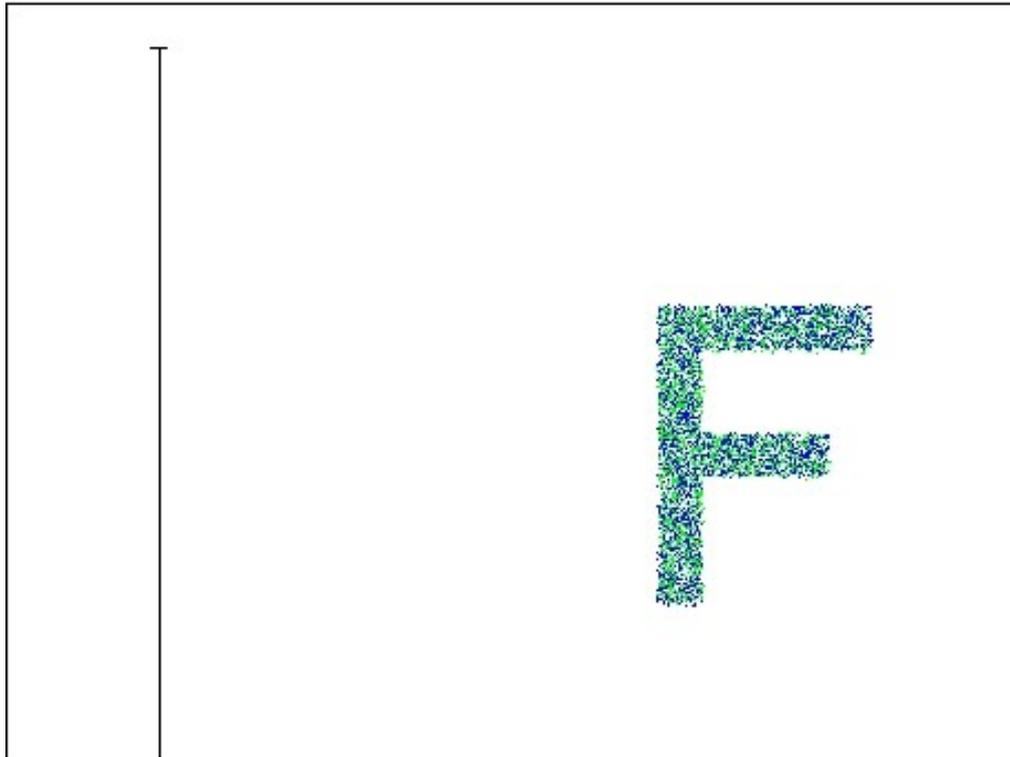
Na Figura IV-13 temos uma seção transversal do sólido de distribuição da energia calculado a partir de um algoritmo FFT, nele podemos observar que a maior parte da energia se concentra no pico central o que nos leva a afirmar que o sistema possui um ótimo padrão de difração, uma vez que um sistema ótimo possui em torno de 84% de energia no pico central (ver apêndice I).



**Figura IV-13: Seção Transversal da Função de Espalhamento Pontual do Sistema para Ampliação de 30x do M.E.**

#### IV.2.4 – AVALIAÇÃO DA IMAGEM

Na Figura IV-14 temos a simulação da imagem de uma letra que seria produzida pelo sistema de ampliação de 30x do M.E., através dela podemos ver o quanto a imagem está nítida e livre de aberrações.



**Figura IV-14: Simulação da imagem produzida pelo Sistema para Magnificação de 30x do M.E.**

### IV.3 - SISTEMA DE MAGNIFICAÇÃO DE 63X

#### IV.3.1 – AVALIAÇÃO DE ABERRAÇÕES

Podemos observar na Figura IV-15 as aberrações de raio que ocorrem em função das coordenadas  $x$  e  $y$  da pupila do sistema de magnificação de 63x, como ilustrado pelo gráfico, esta aberração possui um valor inferior a  $500\mu\text{m}$ . Na Figura IV-16 observamos a diferença de caminho óptico que ocorre em função das coordenadas  $x$  e  $y$  da pupila do sistema de magnificação de 63x, como ilustrado pelo gráfico a diferença de caminho óptico possui um valor inferior a 0.1 unidade de onda. Na Figura IV-17 observamos as distorções que ocorrem na imagem como função das coordenadas da pupila de entrada do sistema de magnificação de 63x, como ilustrado pelo gráfico estas distorções possuem um valor inferior a 0.1%.

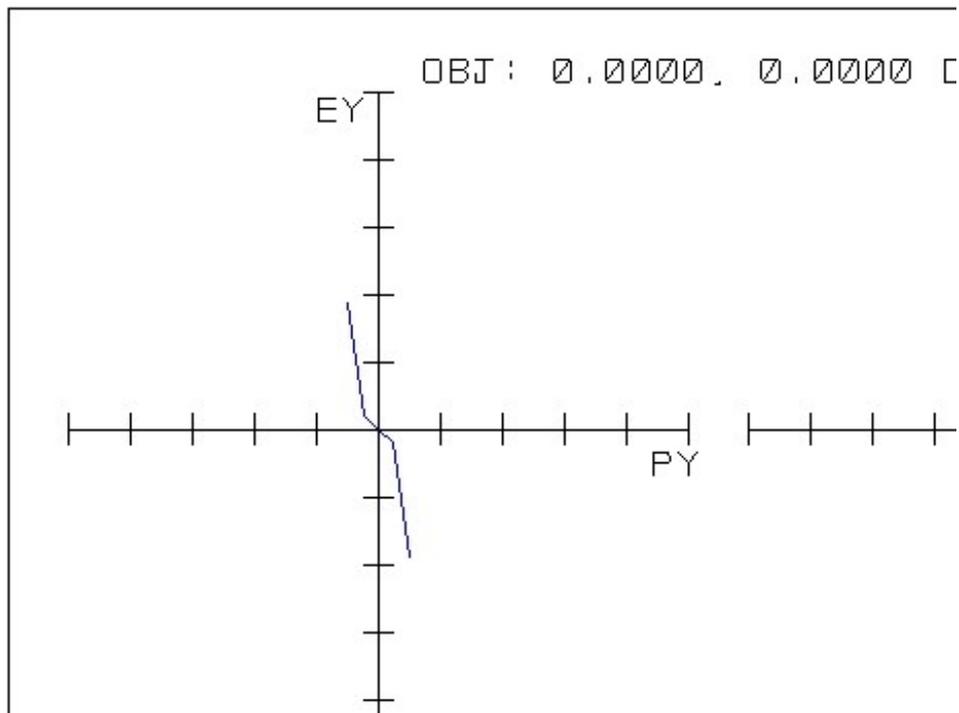


FIGURA IV-15: Aberração de Raio do Sistema Óptico para Magnificação de 63x do M.E.

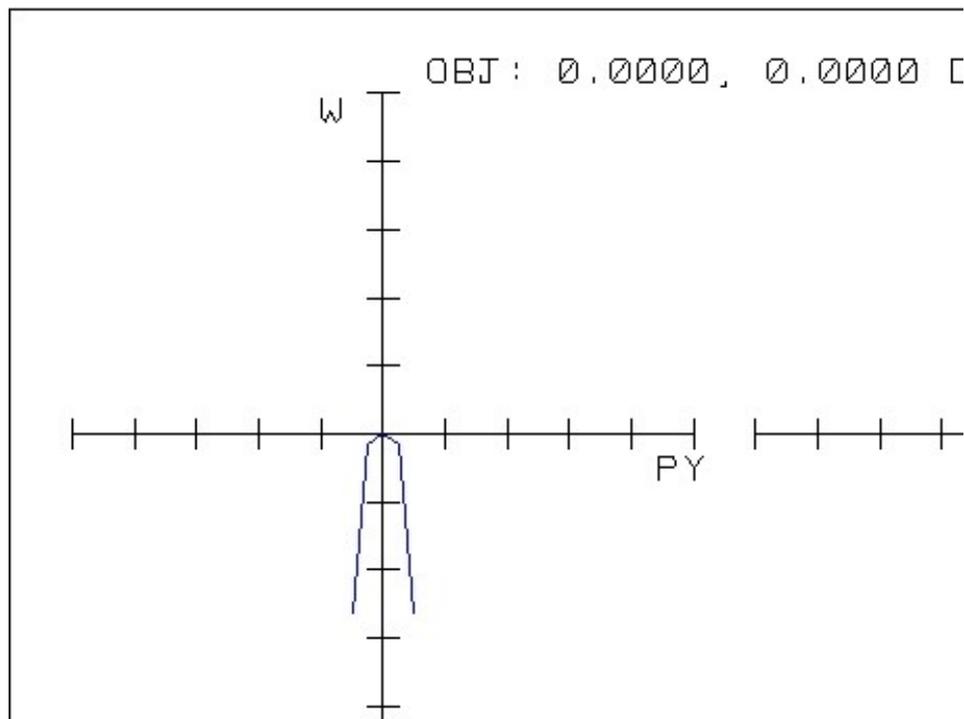
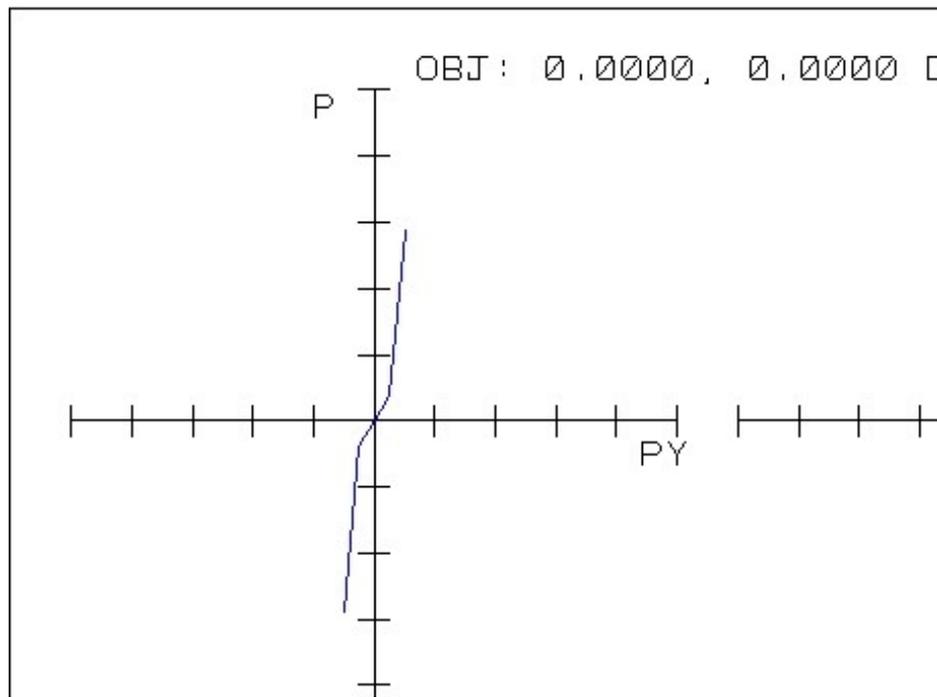


FIGURA IV-16: Diferença de caminho óptico do Sistema Óptico para Magnificação de 63x do M.E.



**FIGURA IV-17: Aberração da Pupila de Entrada do Sistema Óptico para Magnificação de 63x do M.E.**

#### IV.3.2 – AVALIAÇÃO POR DIAGRAMAS DE SPOTS

Nas Figuras IV-18 e IV-19 podemos avaliar as aberrações do sistema de magnificação de 63x através do diagrama de *spot*. Na Figura IV-18 observamos que o diagrama apresenta um raio do spot que tende a 0  $\mu\text{m}$ , isto indica que, apesar das aberrações mostradas pelas Figuras IV-15, IV-16, e IV-17, o sistema não apresenta problemas na formação de imagens.

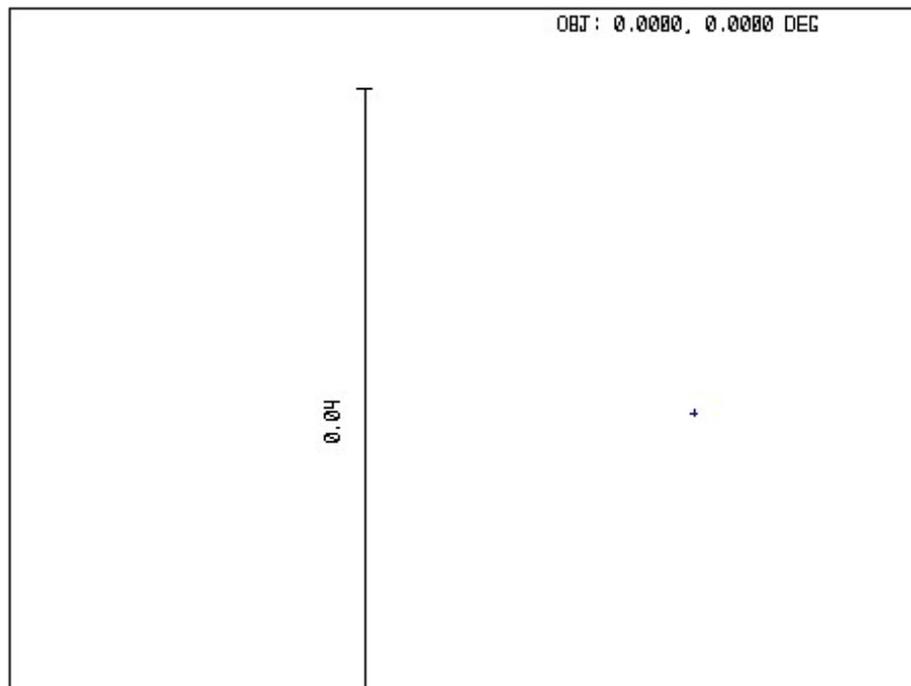


Figura IV-18: Diagrama de Spot do Sistema para Magnificação de 63x do M.E.

Na Figura IV-19 podemos observar que a variação do diâmetro do spot com a variação do plano focal é inexistente pois o raio do spot se mantém a  $0\mu\text{m}$  para qualquer posição.

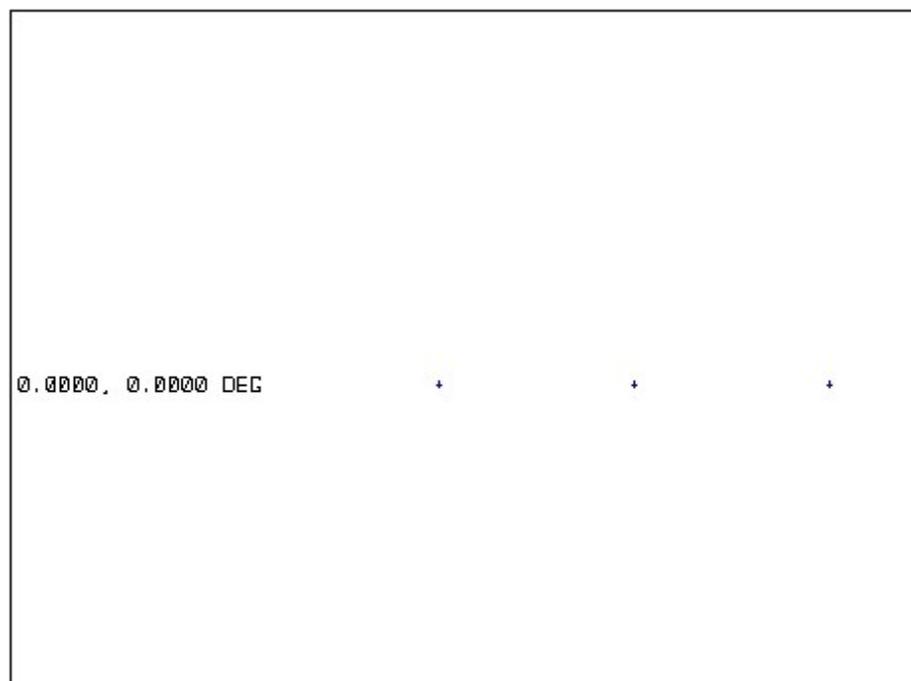
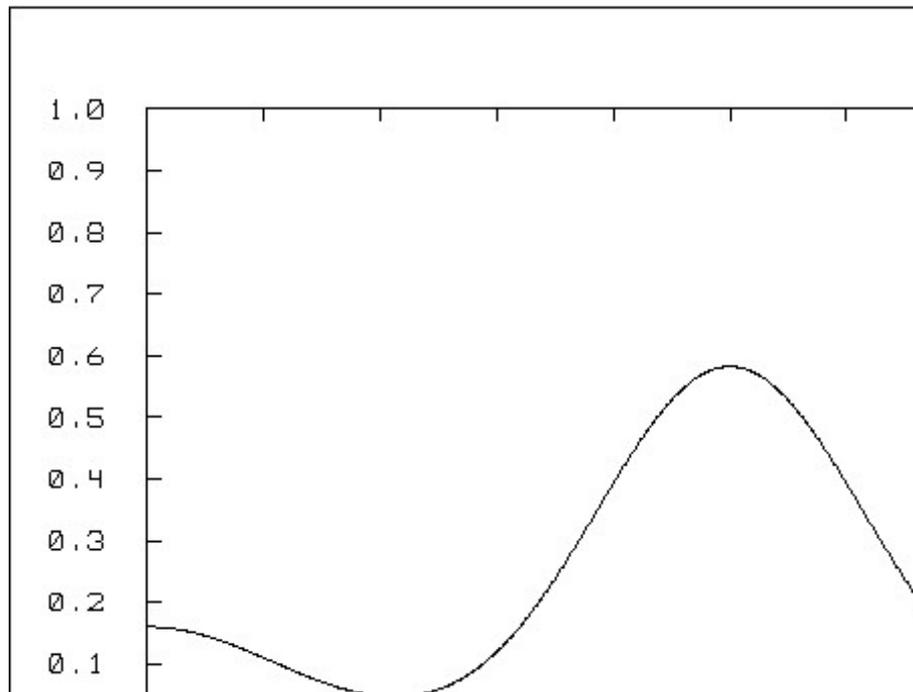


Figura IV-19: Variação do Diagrama de Spot com a Variação do Plano Focal da Imagem do Sistema para Magnificação de 63x do M.E.

#### IV.3.3 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ENERGIA NA IMAGEM

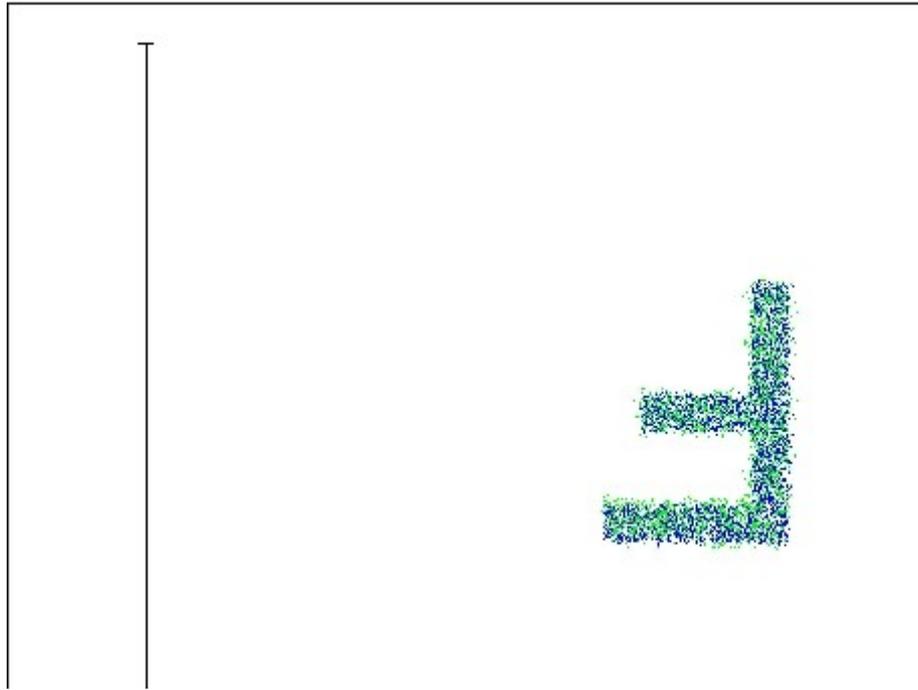
Na Figura IV-20 temos uma seção transversal do sólido de distribuição da energia calculado a partir de um algoritmo FFT, nele podemos observar que uma boa parte da energia se concentra no pico central o que nos leva a afirmar que o sistema possui um bom padrão de difração, uma vez que um sistema ótimo possui em torno de 84% de energia no pico central (ver apêndice I).



**Figura IV-20: Seção Transversal da Função de Espalhamento Pontual do Sistema para Magnificação de 63x do M.E.**

#### IV.3.4 – AVALIAÇÃO DA IMAGEM

Na Figura IV-21 temos a simulação da imagem de uma letra que seria produzida pelo sistema de magnificação de 63x do M.E., através dela podemos ver o quanto a imagem esta nítida e livre de aberrações.



**Figura IV-21: Simulação da imagem produzida pelo Sistema para Magnificação de 63x do M.E.**

#### IV.4 SISTEMA DE MAGNIFICAÇÃO DE 136x

##### IV.4.1 – AVALIAÇÃO DE ABERRAÇÕES

Podemos observar na Figura IV-22 as aberrações de raio que ocorrem em função das coordenadas  $x$  e  $y$  da pupila do sistema de magnificação de 136x, como ilustrado pelo gráfico, esta aberração possui um valor inferior a  $500\mu\text{m}$ . Na Figura IV-23 observamos a diferença de caminho óptico que ocorre em função das coordenadas  $x$  e  $y$  da pupila do sistema de magnificação de 136x, como ilustrado pelo gráfico a diferença de caminho óptico possui um valor inferior a 0.05 unidade de onda. Na Figura IV-24 observamos as distorções que ocorrem na imagem como função das coordenadas da pupila de entrada do sistema de magnificação de 136x, como ilustrado pelo gráfico estas distorções possuem um valor inferior a 0.01%.

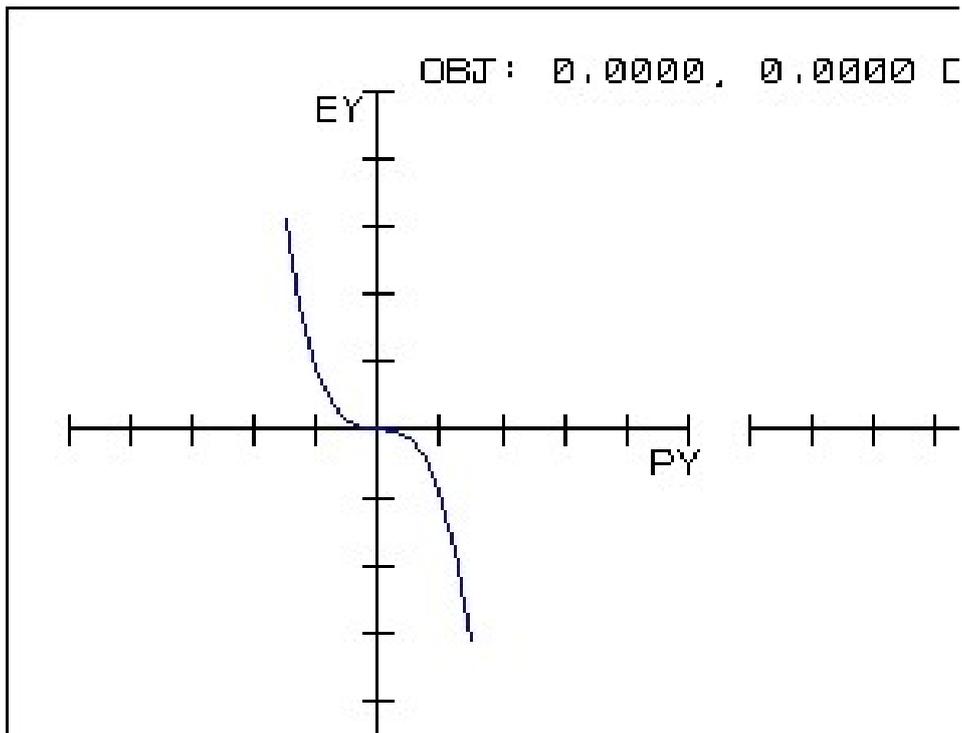


FIGURA IV-22: Aberração de Raio do Sistema Óptico para Magnificação de 136x do M.E.

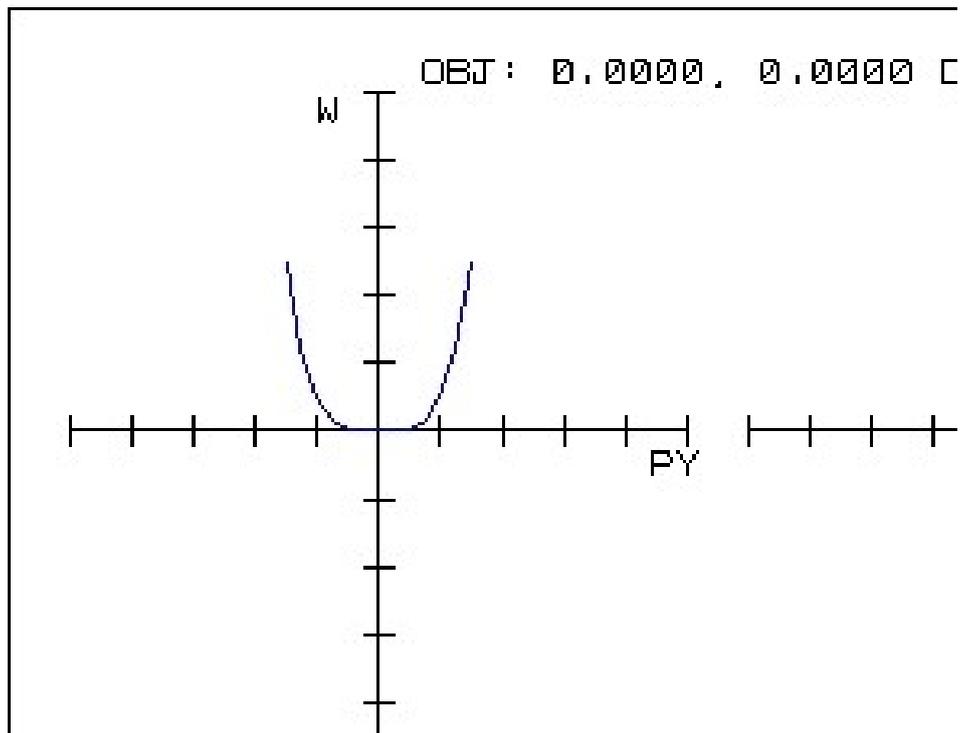


FIGURA IV-23: Diferença de caminho óptico do Sistema Óptico para Magnificação de 136x do M.E.

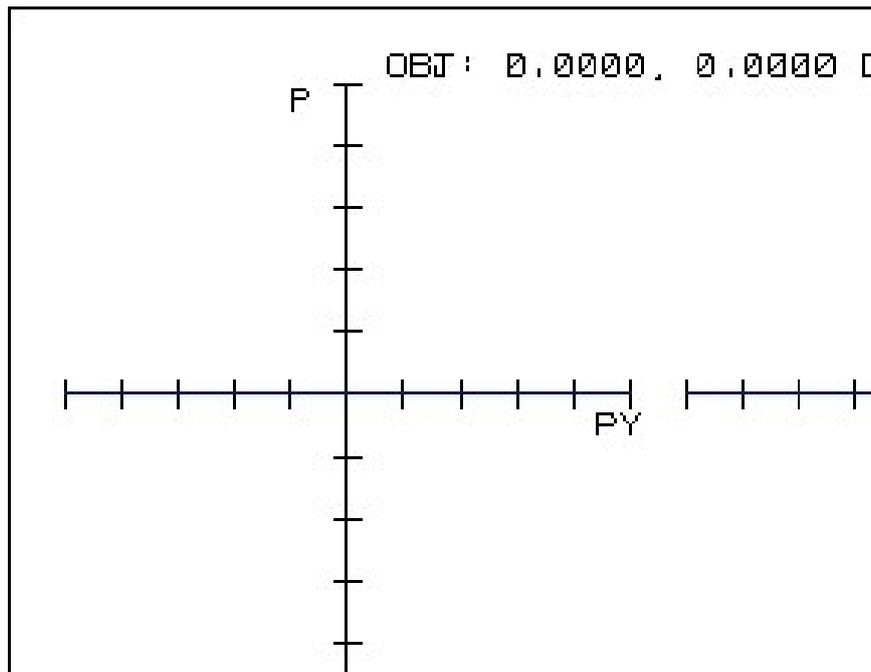


FIGURA IV-24: Aberração da Pupila de Entrada do Sistema Óptico para Magnificação de 136x do M.E.

#### IV.4.2 – AVALIAÇÃO POR DIAGRAMAS DE SPOTS

Nas Figuras IV-25 e IV-26 podemos avaliar as aberrações do sistema de magnificação de 136x através do diagrama de *spot*. Na Figura IV-25 observamos que o diagrama apresenta um raio de 53.388  $\mu\text{m}$ .

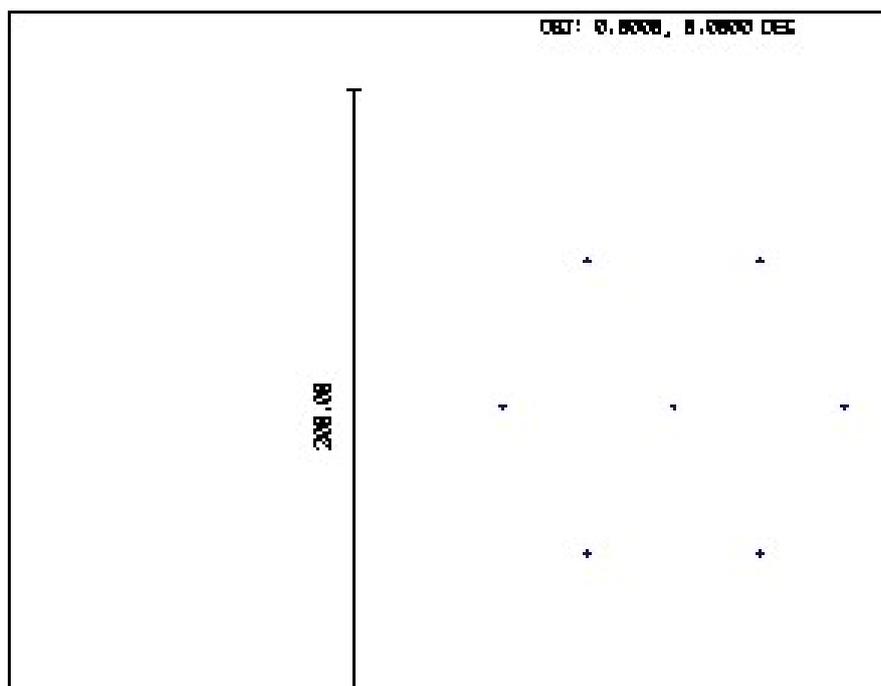
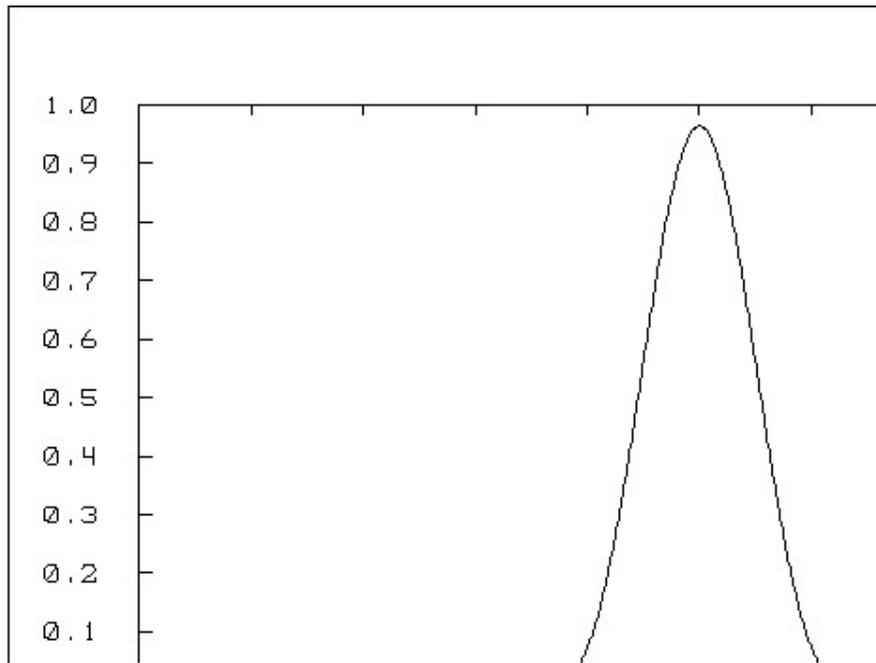


Figura IV-25: Diagrama de Spot do Sistema para Magnificação de 136x do M.E.

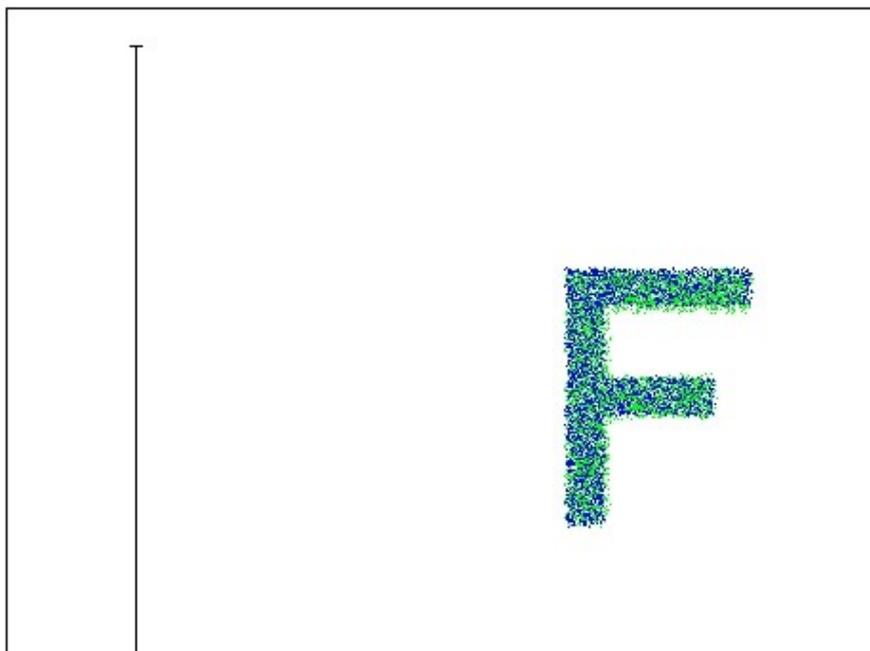




**Figura IV-27: Seção Transversal da Função de Espalhamento Pontual do Sistema para Magnificação de 136x do M.E.**

#### IV.4.4 – AVALIAÇÃO DA IMAGEM

Na Figura IV-28 temos a simulação da imagem de uma letra que seria produzida pelo sistema de magnificação de 136x do M.E., através dela podemos ver o quanto a imagem esta nítida e livre de aberrações.



**Figura IV-28: Simulação da imagem produzida pelo Sistema para Magnificação de 136x do M.E.**

#### IV.5 SISTEMA DE MAGNIFICAÇÃO DE 205X

##### IV.5.1 – AVALIAÇÃO DE ABERRAÇÕES

Podemos observar na Figura IV-29 as aberrações de raio que ocorrem em função das coordenadas x e y da pupila do sistema de magnificação de 205x, como ilustrado pelo gráfico, esta aberração possui um valor inferior a  $50\mu\text{m}$ . Na Figura IV-30 observamos a diferença de caminho óptico que ocorre em função das coordenadas x e y da pupila do sistema de magnificação de 205x, como ilustrado pelo gráfico a diferença de caminho óptico possui um valor inferior a 0.01 unidade de onda. Na Figura IV-31 observamos as distorções que ocorrem na imagem como função das coordenadas da pupila de entrada do sistema de magnificação de 205x, como ilustrado pelo gráfico estas distorções possuem um valor inferior a 0.01%.

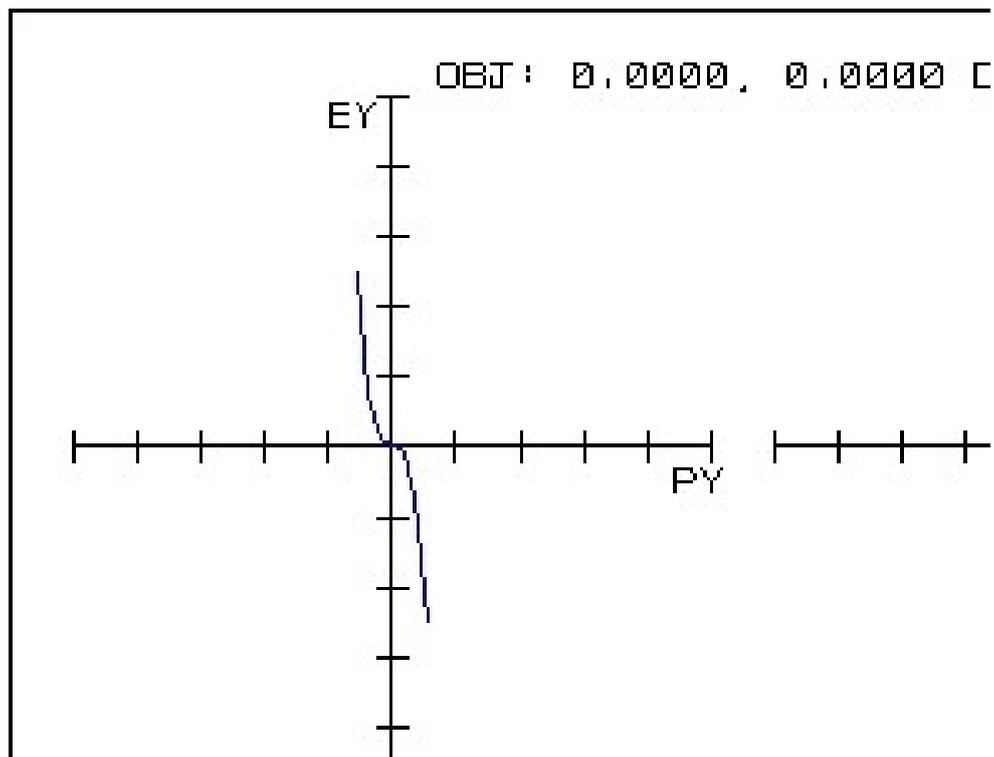


FIGURA IV-29: Aberração de Raio do Sistema Óptico para Magnificação de 205x do M.E.

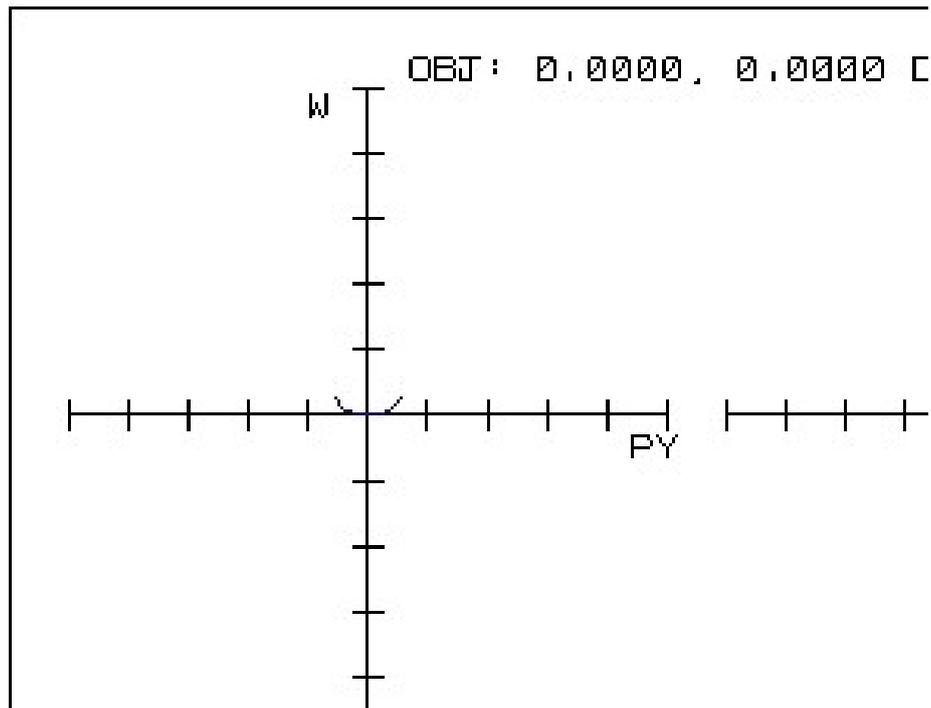


FIGURA IV-30: Diferença de caminho óptico do Sistema Óptico para Magnificação de 205x do M.E.

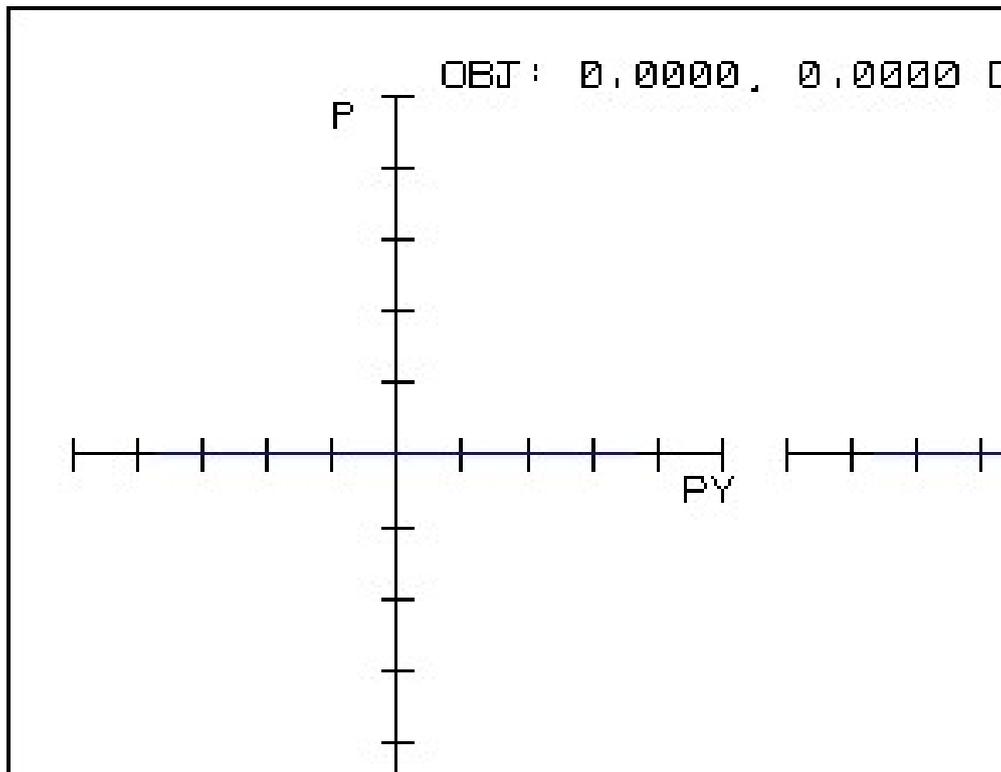
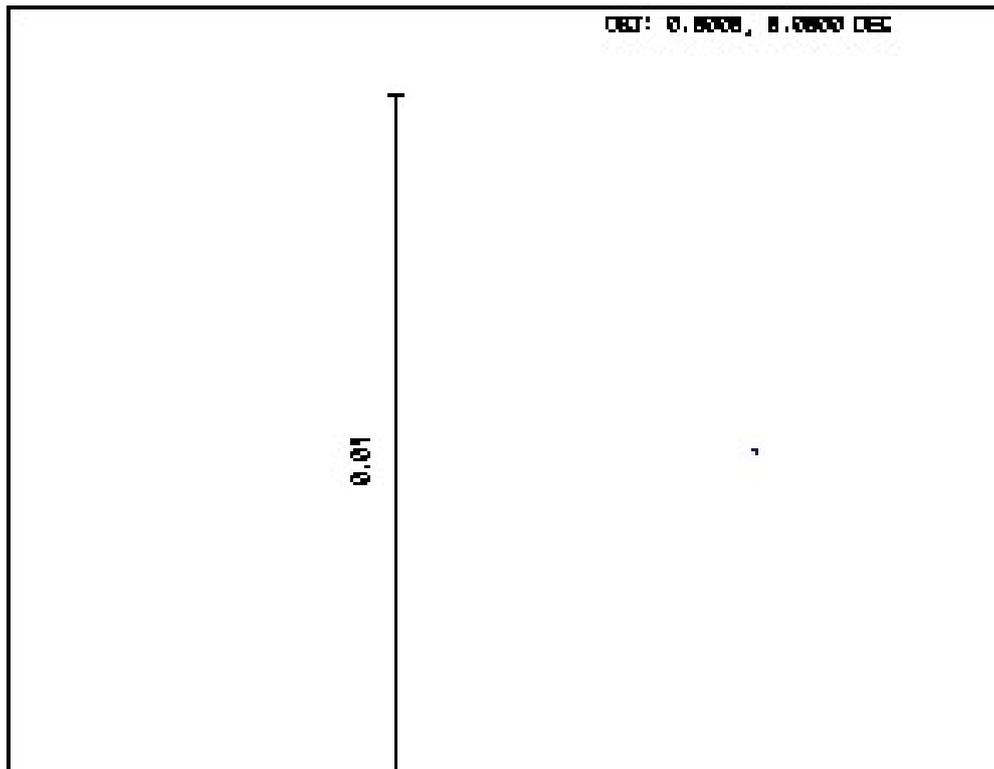


FIGURA IV-31: Aberração da Pupila de Entrada do Sistema Óptico para Magnificação de 205x do M.E.

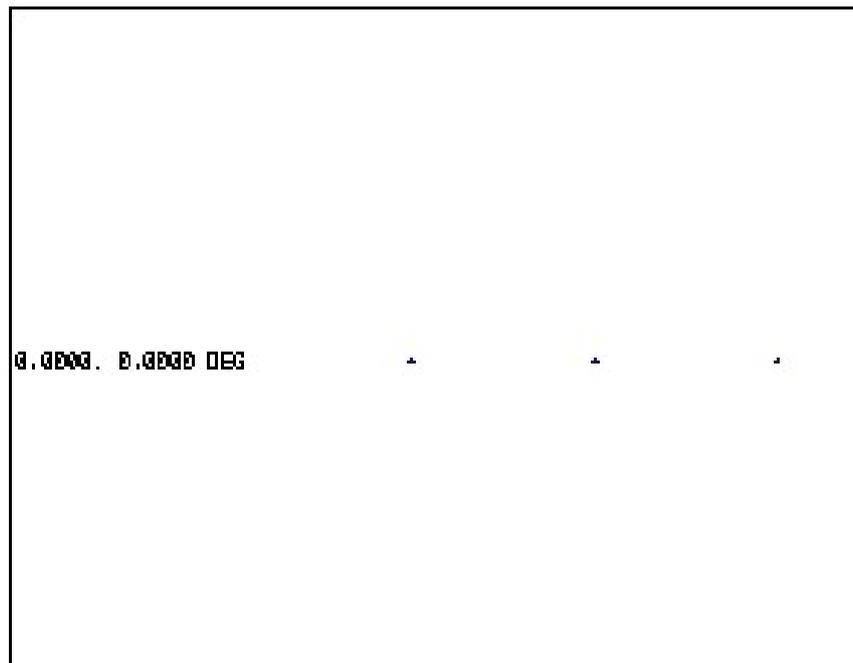
#### IV.5.2 – AVALIAÇÃO POR DIAGRAMAS DE SPOTS

Nas Figuras IV-32 e IV-33 podemos avaliar as aberrações do sistema de magnificação de 205x através do diagrama de *spot*. Na Figura IV-32 observamos que o diagrama apresenta um raio do spot que tende a 0  $\mu\text{m}$ , isto indica que, apesar das aberrações mostradas pelas Figuras 51, 52, e 53, o sistema não apresenta problemas na formação de imagens.



**Figura IV-32: Diagrama de Spot do Sistema para Magnificação de 205x do M.E.**

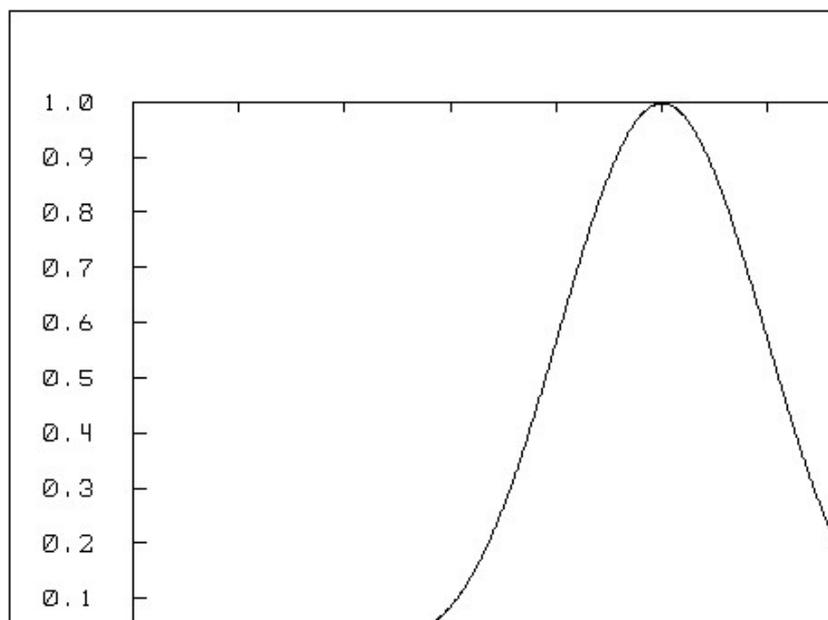
Na Figura IV-33 podemos observar que a variação do diâmetro do spot com a variação do plano focal é inexistente pois o raio do spot se mantém a 0  $\mu\text{m}$  para qualquer posição.



**Figura IV-33: Variação do Diagrama de Spot com a Variação do Plano Focal da Imagem do Sistema para Magnificação de 205x do M.E.**

#### IV.5.3 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ENERGIA NA IMAGEM

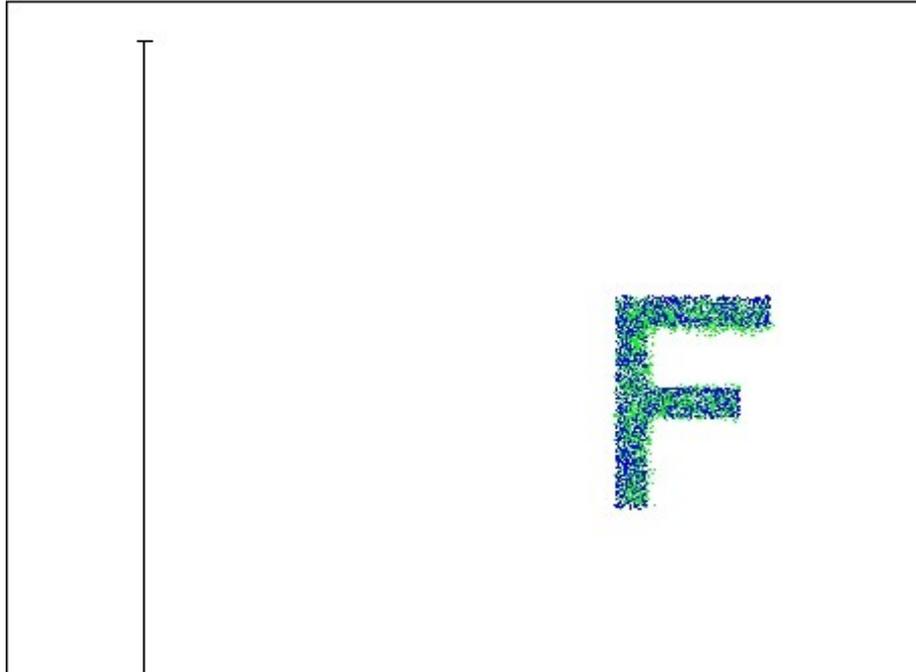
Na Figura IV-34 temos uma seção transversal do sólido de distribuição da energia calculado a partir de um algoritmo FFT, nele podemos observar que a maior parte da energia se concentra no pico central o que nos leva a afirmar que o sistema possui um ótimo padrão de difração, uma vez que um sistema ótimo possui em torno de 84% de energia no pico central (ver apêndice I).



**Figura IV-34: Seção Transversal da Função de Espalhamento Pontual do Sistema para Magnificação de 205x do M.E.**

#### IV.5.4 – AVALIAÇÃO DA IMAGEM

Na Figura IV-35 temos a simulação da imagem de uma letra que seria produzida pelo sistema de magnificação de 205x do M.E., através dela podemos ver o quanto a imagem esta nítida e livre de aberrações.



**Figura IV-35: Simulação da imagem produzida pelo Sistema para Magnificação de 205x do M.E.**

## ANEXO 1

### CONGRESSOS

1. GAZZIRO, M. B.; CHIARADIA, C.; ROTTA, R.T.; RIBEIRO Jr, P.E.M.; ISAAC, F.; SOUSA, S.J.F.; VENTURA, L.; Medidas Automatizadas de Áreas de Úlceras de Córnea IV Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 07-09 de Outubro de 1996.

2. RIBEIRO Jr, P.E.M.; ISAAC, F.; SOUSA, S.J.F.; VENTURA, L.; - Desenvolvimento de um Sistema para a Contagem Automatizada de Células Endoteliais da Córnea - III FÓRUM NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM SAÚDE - Campos do Jordão (SP) - 13 a 17 de Outubro de 1996.

3. RIBEIRO Jr, P.E.M.; ISAAC, F.; SOUSA, S.J.F.; VENTURA, L.; - Desenvolvimento de um Sistema para a Contagem Automatizada de Células Endoteliais da Córnea - XXXII REUNIÃO ANUAL DO C.E.O. "CYRO REZENDE" - Ribeirão Preto (SP) - 18 a 19 de Outubro de 1996.

4. VENTURA, L.; RIBEIRO Jr, P.E.M.; ISAAC, F.; SOUSA, S.J.F.; - Sistema Automático de Análise de Células Endoteliais de Córneas Doadas para Utilização em Bancos de Olhos - XX ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA - Caxambu (MG) - 10 a 14 de Junho de 1997.

5. 36 ISAAC, F.; RIBEIRO Jr, P.E.M.; SOUSA, S.J.F.; VENTURA, L.; Desenho Óptico para Sistema de Magnificação de Imagens de Células Endoteliais de Córneas "In Vitro" para Utilização em Bancos de Olhos - XX ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA - Caxambu (MG) - 10 a 14 de Junho de 1997.

6. 37 CAETANO, C.A.C.; VENTURA, L.; SOUSA, S.J.F.; AMÔRES, E.B.; RIBEIRO Jr, P.E.M.; ISAAC, F.; Sistema Computacional de Contagem

Automática de Células Endoteliais de Córneas "In Vitro" - XX ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA - Caxambu (MG) - 10 a 14 de Junho de 1997.

7. ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S.J.F.; Projeto Ótico de um Sistema de Magnificação de Imagem para Análise do Endotélio XXI ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA, 02 a 06 de Junho de 1998, Hotel Glória, Caxambu (MG).

8. ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S.J.F.; Componentes Ópticos Adaptáveis à Lâmpada de Fenda para Análise Simultânea do Olho Humano com as Oculares XXII ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA, 11 a 15 de Maio de 1999, Hotel Primus, São Lourenço (MG).

9. ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S.J.F.; Componente Ótico para Magnificação de Imagem em Lâmpada de Fenda XXXV REUNIÃO ANUAL DO C.E.O. "CYRO REZENDE", 03 a 04 de Dezembro de 1999, Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto (SP).

10. ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S.J.F.; Adaptador Ótico para Multi-Sistema de Avaliação e Mensuração Ocular em Lâmpada de Fenda XXIII ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA, 09 a 13 de Maio de 2000, Hotel Primus, São Lourenço (MG).

11. Flávio Isaac, Liliane Ventura, Sidney Júlio de Faria e Sousa, Desenvolvimento de um Microscópio Especular Modular para Banco de Olhos, XXV Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 07 - 11 de maio de 2002 - Caxambu – MG

12. ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S. J. F. Desenvolvimento de Sistema Óptico Compacto para Avaliação de Córneas Humanas, XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 09 à 12 de setembro de 2002, São José dos Campos, SP, Brasil.

13. ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S. J. F.; Desenvolvimento de Microscópio Especular Modular para Avaliação de Córneas Humanas Doadas, I Workshop Regional de Engenharia Biomédica, 17 - 18 de outubro de 2002, São Carlos, SP, Brasil.

14. ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S. J. F.; Desenvolvimento de um sistema óptico de avaliação de células endoteliais para Banco de Olhos, XXVI Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 6 à 10 de maio de 2003, Caxambu (MG).

15. ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S.J.F.; Desenvolvimento Um Microscópio Especular De Não-Contato Para Banco De Olhos Com Várias Magnificações, XXXII Congresso Brasileiro de Oftalmologia, 09 - 13 de Setembro de 2003, Salvador - BA.

16. F. Isaac; L. Ventura; S.J.F. Sousa; Desenvolvimento de um microscópio especular nacional a baixo custo- II Workshop Regional em Engenharia Biomédica - 29 -31 de Outubro de 2003 - São Pedro – SP

17. VENTURA, L.; SOUSA, S. J. F.; RIBEIRO Jr., P.E.M.; ISAAC, F.; CAETANO,C.A.C.;- Optical System Attached to a Slit Lamp for Automatic Evaluation of the Endothelial Cells of Donated Corneas - World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering - Sept. 14 - 19, 1997, Nice, France.

18. CAETANO,C.A.C.; VENTURA, L.; ISAAC, F.; SOUSA, S. J..F, LOTUFO, R.A.; Automated specular microscopy in slit lamp, SPIE - BiO'S 2000 - International Symposium on Biomedical Optics - OPHTHALMIC TECHNOLOGIES X Jan. 22-28, 2000, San Jose (CA). E.U.A.

19. VENTURA, L.; CHIARADIA, C.; MESSIAS, A.M.V.; ISAAC, F.; SOUSA, S. J.

F.; ROSA Filho, A. B.; SPIE - Automatic Multi-Diagnose System for Slit Lamp BIO'S 2001 - INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOMEDICAL OPTICS - OPHTHALMIC TECHNOLOGIES XI, Jan. 20-26, 2001, San Jose (CA). E.U.A.

20. ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S.J.F.; Development of a modular specular microscope for eye bank at low cost, SPIE 2003 - Ophthalmic Technologies XIII 25-31 January 2003, San Jose, California, USA

21. VENTURA, L.; ISAAC, F.; SOUSA, S.J.F.; SCHIABEL, H.; Cliquet Jr., A.; Specular microscope with various magnifications for donated corneas, SPIE 2004 - Ophthalmic Technologies XIV - 24-29 January 2004, San Jose, California, USA

### ***PUBLICAÇÕES EM REVISTAS***

1. VENTURA, L.; ISAAC, F.; CAETANO, C.A.C.; SOUSA, S.J.F.; RIBEIRO Jr, P.E.M.; Sistema de Avaliação Objetiva de Células Endoteliais de Córneas Doadas - Rev. Fís. Aplic. Inst. vol.13, nº 04, p. 92-98, Dez. 1998.

2. VENTURA, L.; SOUSA, S. J. F.; RIBEIRO Jr, P.E.M.; ISAAC, F.; CAETANO, C.A.C.;- Optical System Attached to a Slit Lamp for Automatic Evaluation of the Endothelial Cells of Donated Corneas - Medical & Biological Engineering & Computing - Journal of the International Federation for Medical & Biological Engineering - Abstracts, vol. 35, p. 109, Supplement Part1, 1997.

3. CAETANO, C.A.C.; VENTURA, L.; ISAAC, F.; SOUSA, S.J.F.; , LOTUFO, R.A.; Automated specular microscopy in slit lamp, - Ophthalmic Technologies X - (SPIE - The International Society for Optical Engineering), V. 3908, p.236 - 242, 2000.

4. CAETANO, C.A.C.; VENTURA, L.; ISAAC, F.; SOUSA, S.J.F.; , LOTUFO, R.A.; Automated specular microscopy in slit lamp, - Ophthalmic Technologies X

- (SPIE - The International Society for Optical Engineering), V. 3908, p.236 - 242, 2000.

5. VENTURA, L.; CAETANO,C.A.C.; SOUSA, S.J.F.; ISAAC, F.; CHIARADIA, C.; LOTUFO, R.A.; "In Vitro" Corneal Endothelium Cells Analyzer System for Slit Lamp, IEEE - Engineering in Medicine & Biology Magazine, ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM MAIO DE 2000.

6. VENTURA, L.; CHIARADIA, C.; MESSIAS, A.M.V.; SOUSA, S.J.F.; ISAAC, F.; CAETANO,C.A.C.; ROSA, A.B.; Automatic Multi Diagnose System for Slit Lamp - Ophthalmic Technologies XI - (SPIE - The International Society for Optical Engineering), V. 4245, P. 262 - 269, Janeiro de 2001.

7. VENTURA, L.; CAETANO, C.A.C.; SOUSA, S. J.F, ISAAC, F.; CHIARADIA, C.; LOTUFO, R.A.; "In Vitro" Corneal Endothelium Cells Analyzer System  
for Slit Lamp, IEEE - Engineering in Medicine & Biology Magazine, vol. 21, n.6,p.92-98 Nov./Dec.2002.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1- CAETANO, C. A. C. Desenvolvimento de um Sistema de Contagem de Células endoteliais para Lâmpada de Fenda para Córneas *In Vitro*. Ribeirão Preto, Tese de Mestrado, FFCLRP – USP, 1999.
- 2- CAETANO, C. A. C. Desenvolvimento de um Multi – Sistema de Diagnóstico Ocular para Lâmpada de Fenda. Ribeirão Preto, Tese de Doutorado, FFCLRP – USP, 2003.
- 3- <http://www.bio-optics.com/>
- 4- <http://www.hailabs.com/>
- 5- <http://www.konan-inc.co.jp/>
- 6- ABE, K.; FUJII, T. Apparatus for Observing Cornea for Transplantation. US Patent 5.956.123, 21/09/1999
- 7- <http://www.engbrasil.eng.br/mic.pdf>
- 8- KLYCE, S. D, and BEUERMAN, R. W. The Cornea – Structure and Function of the Cornea. Newton, Butterworth-Heinemann, 1998, p. 3-45.
- 9- POWER, W. J. and NEVES, R. A. Córnea Clínica – Cirúrgica – Anatomia e Fisiologia da Córnea. São Paulo, Editora Roca Ltda, 1996, p. 3-15.
- 10-MAURICE, D. M. The structure and transparency of the cornea. J. *Physiol.*, 136:263, 1957.
- 11-ABIB, F. C. Microscopia Especular de Córnea. Rio de Janeiro, Rio Med Livros Ltda e Livraria e Editora Revinter Ltda, 2000, 140p
- 12-LAING, R. A.; SANDSTROM M. M.; LEIBOWITZ H. M. Clinical specular microscopy: II. Qualitative evaluation of corneal endothelial photomicrographs. *Archv Ophthalmol*, v. 97, n. 9, p 1720-1725, 1979.
- 13- LAING, R. A. et al. Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res*, v. 22, p. 587-594, 1976.
- 14-LAING, R. A. et al Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium, *Ophthalmology*, v. 91, n. 10, p. 1129-1134, 1984.
- 15-SMITH, J. S. Modern Optical Engineering – The Design of Optical System. New York, McGraw – Hill Book Company, 1990, 524p.

- 16-HECHT, E., ZAJAC, A. *Optica*. Wilmington, Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., 1986, 586p.
- 17-PEDROTTI, L. S. *Optics and Vision*. New Jersey, Prentice-Hall, 1998, 395p.
- 18-LAING, R. A.; SANDSTROM M. M.; LEIBOWITZ H. M. *Clinical specular microscopy: I. Optical Principles*. *Archv Ophthalmol*, v. 97, n. 9, p 1714-1719, 1979.
- 19-<http://www.opsweb.org/Op-Photo/SlitLamp/Specular/Spec.htm>
- 20-CHAMON, W. & JUNIOR, R. B. *Microscopia Especular, em Córnea Clínica – Cirúrgica*, Ed. ROCA Ltda, São Paulo, cap. 14, p. 139-145.
- 21-BOURNE, W. M. & KAUFMAN, H. E. *Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo*. *Am J Ophthalmol*, v. 81, n. 3, p. 319-323, 1986.
- 22-STURROCK, G. D.; SHERRARD, E. S. & RICE, N. S. C. *Specular microscopy of the corneal endothelium*. *British Journal of Ophthalmology*, 1978, 62, 809-814
- 23-PRICE, N. C. & CHENG, H. *Contact and Noncontact specular microscopy*. *British Journal of Ophthalmology*, 1981, 65, 568-574
- 24-BOURNE, W. M. & ENOCH, J. M. *Some optical principles of the clinical specular microscope*. *Investigative Ophthalmology*, 15, 29 - 32, 1976.
- 25-YOSHINO, H.; TAKAGI, K. *Specular Microscope*. US Patent 4.597.650
- 26-RUSINOV, M. M., JUDOYA, G. N., KUDRYASHOV, J.V. & AGUROK, P. Y., *Galilean-Type Telescope system*, US Patent 4.390.249, 28/06/1983.
- 27-ERFLE, H., *Lens System for Galilean Telescopes*, United States Patent, 1,507,111, Sept. 02, 1924.
- 28-MILES, J. R., *Optical System for Variable Power Galilean Telescopes*, United States Patent, 2,578,574, Dec. 11, 1951.
- 29-BERTELE, L., *Galilean - Type Telescope System*, United States Patent, 3,663,094, May 16, 1972.
- 30-MAURICE, D. M. *A scanning slit optical microscope*, *Invest Ophthalmology*. 13, 1033 – 1037, 1974
- 31-MINSKY, M. *Microscopy apparatus*, U.S. patent 3013467, 19/12/1961
- 32-FOCUS SOFTWARE, INC. *Zemax – Optical Design Program. User's Guide – version 6.0*, 1997

33-Prêmio de melhor trabalho apresentado na categoria de trabalho original, não oriundo de dissertações ou teses de Oftalmologia (PRÊMIO Prof. Dr. Harley E. A. Bicas), apresentado no congresso de Oftalmologia: "XXXV REUNIÃO ANUAL DO C.E.O. "CYRO REZENDE", 03 a 04 de Dezembro de 1999", dos autores: ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S. J..F., intitulado: Componente Ótico para Magnificação de Imagem em Lâmpada de Fenda.

34-Prêmio de melhor trabalho apresentado (PRÊMIO Prof. Dr. almiro azeredo), apresentado no congresso de Oftalmologia: "XXXV REUNIÃO ANUAL DO C.E.O. "CYRO REZENDE", 03 a 04 de Dezembro de 1999", dos autores: ISAAC, F.; VENTURA, L.; SOUSA, S. J..F., intitulado: Componente Ótico para Magnificação de Imagem em Lâmpada de Fenda, no valor de R\$1.000,00.

## **SUMÁRIO**

<b>RESUMO.....</b>	<b>8</b>
<b>SUMMARY/ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 - A CÓRNEA HUMANA E O PRINCÍPIO DE MICROSCOPIA ESPECULAR .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 - A Córnea Humana <sup>(8, 9, 10)</sup>.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 - O Endotélio Corneano <sup>(9 - 14)</sup> .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 – A Microscopia Especular <sup>(3, 12 – 14)</sup>.....</b>	<b>17</b>
2.3.1 - AS LEIS DE REFLEXÃO E REFRAÇÃO <sup>(15 - 17)</sup> .....	18
2.3.2 - REFLEXÃO ESPECULAR NA CÓRNEA <sup>(18 - 24)</sup> .....	23
2.3.3 - AVALIAÇÃO DE CÓRNEAS DOADAS .....	27
<b>3 – SISTEMA ÓPTICO – MICROSCÓPIO ESPECULAR <sup>(6,11, 12, 18, 25)</sup> .....</b>	<b>29</b>
<b>4 – SISTEMA DESENVOLVIDO .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Projeto Óptico.....</b>	<b>35</b>
4.1.1 - Sistema de Iluminação .....	37
4.1.2 – Microscópio Especular desenvolvido.....	41
4.1.2.1 – Magnificação de 20x .....	41
4.1.2.2 – Magnificação de 30x .....	45
4.1.2.3 – Magnificação de 63x .....	48
4.1.2.4 – Magnificação de 136x .....	51
4.1.2.5 – Magnificação de 205x .....	55
<b>4.2 Montagem do Sistema Ótico.....</b>	<b>58</b>
<b>4.3 Software de Microscopia Especular Utilizado .....</b>	<b>59</b>
4.3.1 Densidade Celular.....	59

4.3.2 Índices de Pleomorfismo e Polimegatismo <sup>(2)</sup> .....	61
4.3.2.1 Polimegatismo .....	62
4.3.2.2 Pleomorfismo .....	63
<b>5 – RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
<b>5.1 – Avaliação do Sistema Projetado .....</b>	<b>64</b>
5.1.1 Sistema de Iluminação.....	64
5.1.1.1 – Avaliação de aberrações .....	64
5.1.1.2 – Avaliação por diagramas de Spots .....	66
5.1.1.3 – Avaliação da Distribuição de Energia na Imagem .....	68
5.1.1.4 – Avaliação da Imagem .....	69
<b>5.2 Avaliação do Sistema de Microscopia Especular .....</b>	<b>70</b>
5.2.1 Sistema de Microscopia Especular Montado em Bancada Óptica .....	70
5.2.2 Avaliação de imagens captadas pelo Sistema de Microscopia Especular Montado em Bancada Óptica .....	73
<b>6 – DISCUSSÕES E CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE I: AVALIAÇÃO DE SISTEMAS ÓPTICOS<sup>(15-17)</sup> .....</b>	<b>82</b>
<b>I.1 - Aberração Cromática.....</b>	<b>82</b>
<b>I.2 – Variação Aberracional com o Diâmetro de Abertura e o Campo.....</b>	<b>84</b>
<b>I.3 – Diferença de Caminho Óptico.....</b>	<b>85</b>
<b>I.4 – Tolerância Aberracional .....</b>	<b>88</b>
<b>I.5 – Distribuição Geométrica de Energia na Imagem.....</b>	<b>90</b>
<b>I.6 – Avaliações feitas pelo Zemax Optical Design Program <sup>(32)</sup> .....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE II: DETALHAMENTO DOS PROJETOS ÓPTICOS DO MICROSCÓPIO ESPECULAR .....</b>	<b>97</b>

**APÊNDICE III: COMPRIMENTO DE ONDA E VIDROS UTILIZADOS NOS SISTEMAS ÓPTICOS DO MICROSCÓPIO ESPECULAR..... 118**

**APENDICE IV: AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS DE MAGNIFICAÇÃO DO MICROSCÓPIO ESPECULAR ..... 119**

**IV.1 - Sistema de Magnificação de 20x..... 119**

IV.1.1 – Avaliação de aberrações..... 119

IV.1.2 – Avaliação por diagramas de spots..... 120

IV.1.3 – Avaliação da Distribuição de Energia na Imagem ..... 122

IV.1.4 – Avaliação da Imagem..... 122

**IV.2 - Sistema de Magnificação de 30x..... 123**

IV.2.1 – Avaliação de aberrações..... 123

IV.2.2 – Avaliação por diagramas de spots..... 125

IV.2.3 – Avaliação da Distribuição de Energia na Imagem ..... 127

IV.2.4 – Avaliação da imagem..... 127

**IV.3 - Sistema de Magnificação de 63x..... 128**

IV.3.1 – Avaliação de aberrações..... 128

IV.3.2 – Avaliação por diagramas de spots..... 130

IV.3.3 – Avaliação da Distribuição de Energia na Imagem ..... 132

IV.3.4 – Avaliação da Imagem..... 132

**IV.4 Sistema de Magnificação de 136x ..... 133**

IV.4.1 – Avaliação de aberrações..... 133

IV.4.2 – Avaliação por Diagramas de Spots ..... 135

IV.4.3 – Avaliação da Distribuição de Energia na Imagem ..... 136

IV.4.4 – Avaliação da Imagem..... 137

**IV.5 Sistema de Magnificação de 205x ..... 138**

IV.5.1 – Avaliação de aberrações..... 138

IV.5.2 – Avaliação por Diagramas de Spots ..... 140

IV.5.3 – Avaliação da Distribuição de Energia na Imagem ..... 141

IV.5.4 – Avaliação da Imagem..... 142

<b>ANEXO 1.....</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>148</b>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Microscópio Especular da BIO – OPTICS, (a) modelo LSM-2100C (b) modelo LSM-2200C/E2.<sup>(3)</sup></i> .....	12
<i>Figura 2: Microscópio Especular da HAI LABS, Inc. (a) modelo HAI EB-2000xyz, (b) modelo HAI EB-3000xyz.<sup>(4)</sup></i> .....	12
<i>Figura 3: Microscópio Especular da KONAN, modelo EKA-98.<sup>(5)</sup></i> .....	13
<i>Figura 4: Projeto Óptico para um M.E. para banco de olhos.<sup>(6)</sup></i> .....	13
<i>Figura 5: Microscopia de varredura mostrando córnea humana normal. 1) epitélio; 2) membrana de bowman; 3) estroma; 4) endotélio. A membrana de descemet não está visível no corte. Aumento de 160x.<sup>(11)</sup></i> .....	15
<i>Figura 6: Células Endoteliais da Córnea Humana<sup>(11)</sup></i> .....	17
<i>Figura 7: Representação gráfica de um feixe de luz incidindo sobre uma interface que separa dois meios com índices de refração diferentes.</i> .....	19
<i>Figura 8: Representação gráfica da reflexão de um feixe de luz incidindo sobre um espelho esférico convexo.</i> .....	20
<i>Figura 9: Representação gráfica de um feixe de luz incidindo sobre uma interface esférica convexa, onde, esta interface separa dois meios com índices de refração diferente.</i> .....	21
<i>Figura 10: Princípio da reversibilidade.</i> .....	22
<i>Figura 11: Trajetória do feixe de luz de sua fonte no microscópio especular, até o plano de imagem no CCD do microscópio. Embora esteja sendo mostrados o epitélio e o endotélio no plano da imagem, na prática só uma camada estará focada.<sup>(18)</sup></i> .....	24
<i>Figura 12: Representação de uma seção óptica quando uma fenda de luz passa pelas várias camadas da córneas e é focalizado na sua superfície posterior.<sup>(18)</sup></i> .....	25
<i>Figura 13: Diagrama esquemático de um microscópio especular de não – contato utilizado em clínica médica, US Patent 4597650<sup>(25)</sup></i> .....	30
<i>Figura 14: Diagrama esquemático de um microscópio especular de não – contato específico para Banco de Olhos, US Patent 5956123<sup>(6)</sup>.</i> .....	32
<i>Figura 15: Diagrama esquemático do microscópio especular projetado.</i> .....	36
<i>Figura 16: Desenho esquemático da lente condensadora do Sistema de Iluminação do M.E.</i> .....	39
<i>Figura 17: Desenho esquemático da lente de projeção do Sistema de Iluminação do M.E.</i> .....	40
<i>Figura 18: Desenho esquemático do Sistema de Iluminação do M.E.</i> .....	40
<i>Figura 19: Sistema objetiva/telescópio galileano do Microscópio Especular para amplificação de 20x.</i> .....	43
<i>Figura 20: Sistema Óptico para aumento definitivo do Microscópio Especular.</i> .....	44
<i>Figura 21: Sistema Óptico completo para o Microscópio Especular com amplificação de 20x.</i> .....	44
<i>Figura 22: Objetiva do Microscópio Especular para amplificação de 30x.</i> .....	47
<i>Figura 23: Sistema Óptico completo para o Microscópio Especular com amplificação de 30x.</i> .....	48
<i>Figura 24: Objetiva do Microscópio Especular para amplificação de 63x.</i> .....	50
<i>Figura 25: Sistema Óptico completo para o Microscópio Especular com amplificação de 63x.</i> .....	51

Figura 26: Objetiva do Microscópio Especular para magnificação de 136x. ....	54
Figura 27: Sistema Óptico completo para o Microscópio Especular com magnificação de 136x. ....	54
Figura 28: Objetiva do Microscópio Especular para magnificação de 205x. ....	57
Figura 29: Sistema Óptico completo para o Microscópio Especular com magnificação de 205x. ....	58
Figura 30: (a) foto do CCD utilizado; (b) curva característica de resposta do CCD para os vários comprimentos de onda, onde o sistema RGB é mostrado (red, green, blue). ....	59
Figura 31: Foto do Microscópio Especular montado em Bancada Óptica.....	59
Figura 32: Tela do sistema de contagem interativo utilizando o método de seleção de área por retângulo.....	60
Figura 33: Tela do Sistema Automático de Calculo de Densidade de Células Endoteliais.....	60
Figura 34: Ícones para cálculo de Polimegatismo e Pleomorfismo acrescentados à tela principal .....	61
Figura 35: Imagem das células identificadas. <sup>(2)</sup> .....	62
Figura 36: Gráfico da distribuição de área (Polimegatismo) entre as células presentes na imagem. <sup>(2)</sup> .....	62
Figura 37: Gráfico da distribuição de variação de formato (Pleomorfismo) entre as células presentes na imagem. <sup>(2)</sup> .....	63
Figura 38: Aberração de Raio do Sistema de Iluminação do M.E., em X ele atinge uma escala máxima de 20 microns. ....	65
Figura 39: OPD Fan do Sistema de Iluminação do M.E. ....	65
Figura 40: Aberração de Pupila de Entrada do Sistema de Iluminação do M.E.....	66
Figura 41: Diagrama de Spot do Sistema de Iluminação do M.E. (a) Diagrama de Spot com a abertura máxima da fenda retangular (5mm de largura). (b) Diagrama de spot com a abertura mínima da fenda retangular (0.5mm de largura).....	67
Figura 42: Variação do Diagrama de Spot com a variação do plano focal da imagem do Sistema de Iluminação do M.E.....	68
Figura 43: Seção Transversal da FFT-PSF do Sistema de Iluminação do M.E. ....	68
Figura 44: Simulação da imagem produzida pelo Sistema de Iluminação do M.E., quando a letra "F" é o objeto de observação. ....	69
Figura 45: Foto do Sistema de Microscópio Especular montado em Bancada Óptica.....	70
Figura 46: Foto do Sistema de Microscópio Especular montado em Bancada Óptica, destacando o sistema de iluminação, o suporte para o frasco preservativo, e a objetiva. ....	71
Figura 47: Foto do Sistema Objetiva/Telescópio Galileano do M.E. ....	71
Figura 48: Desenho esquemático do Sistema Objetiva/Telescópio galileano do M.E. ....	72
Figura 49: Foto em destaque do Sistema de magnificação do M.E. ....	73
Figura 50: Reticulo calibrador plano com graduação de 0.1mm, da Edmunds Scientific. (a) Foto capturada pelo M.E., com magnificação de 40x. (b) Foto capturada pelo M.E., com magnificação de 64x. ....	74

Figura 51: Reticulo calibrador plano com graduação de 0.1mm, da Edmunds Scientific. (a) Foto capturada pelo M.E. com magnificação de 100x. (b) Foto capturada pelo M.E. com magnificação de 160x. ....	74
Figura 52: Reticulo calibrador semi-esférico com graduação de 50 $\mu$ m, da Biotpics. Foto capturada pelo M.E. com magnificação de: (a) 24x, (b) 40x, (c) 64x, (d) 100x, (e) 160x.....	76
Figura 53: Camada de células endoteliais da córnea. Magnificação de 64x. Córnea cedida pelo Banco de Olhos do HCRP em 03/02/2004. ....	77
Figura 54: Camada de células endoteliais da córnea. Córnea cedida pelo Banco de Olhos do HCRP em 03/02/2004. (a) Magnificação de 100x; (b) Magnificação de 160x.....	78
Figura 55: Camada de células endoteliais da córnea humana. (a) Magnificação de 64x; (b) Magnificação de 100x; (c) Magnificação de 160x.....	79
Figura I-1: Diagrama esquemático exemplificando a aberração cromática.....	83
Figura I-2: Diagrama esquemático exemplificando a aberração esférica em termos de raios de luz, para um feixe monocromático (as cores são para distinguir os raios).....	84
Figura I-3: Diagrama esquemático exemplificando o coma em termos de raios de luz. ....	85
Figura I-4: Diagrama esquemático exemplificando a aberração esférica, em termos de frentes de ondas e de raios de luz. ....	86
Figura I-5: Diagrama esquemático exemplificando o astigmatismo, em termos de raios de luz. a) visão frontal da lente com o segmento de reta AB que indica o corte meridional da lente e o segmento de reta CD que indica o corte sagital da lente. b) corte lateral da lente onde se observa o plano meridional. c) corte lateral da lente onde se observa o plano sagital. ....	87
Figura I-6: Representação esquemática de dois padrões de difração referentes as imagens de dois pontos luminosos.....	88
Figura I-7: Representação esquemática de um sistema óptico produzindo uma imagem devido a uma única fonte pontual. ....	89
Figura I-8: (a) Padrão de difração produzido por uma lente ótima, (b) Distribuição de energia no disco central e anéis subseqüentes. ....	90
Figura I-9: Representação de como é feita a divisão em áreas iguais de uma pupila, onde cada ponto nas Figuras indica o local em que cada raio proveninete do mesmo ponto no objeto deverá passar. (a) Distribuição Polar. (b) Distribuição retangular. ....	91
Figura I-10: Diagrama de Spot do projeto óptico de um Dupleto Gaussiânico do “ZEMAX-XE: optical design Program”. ....	92
Figura I-11: Projeto óptico de um Dupleto Gaussiânico do “ZEMAX-XE: optical design Program”.....	93
Figura I-12: Desenho esquemático do Projeto óptico de um Dupleto Gaussiânico do “ZEMAX-XE: optical design Program”.....	94
Figura I-13: Projeto óptico de um Dupleto Gaussiânico do “ZEMAX-XE: optical design Program”. Distribuição de energia em uma imagem de um ponto do objeto. ....	94
Figura I-14: Projeto óptico de um Dupleto Gaussiânico do “ZEMAX-XE: optical design Program”. Função de espalhamento pontual da imagem (PSF). ....	95

<i>Figura IV-1: Aberração de Raio do Sistema Óptico para Magnificação de 20x do M.E.</i> .....	119
<i>Figura IV-2: Diferença de caminho óptico do Sistema Óptico para Magnificação de 20x do M.E.</i> .....	120
<i>FIGURA IV-3: Aberração da Pupila de Entrada do Sistema Óptico para Magnificação de 20x do M.E.</i> .....	120
<i>Figura IV-4: Diagrama de Spot do Sistema para Magnificação de 20x do M.E.</i> .....	121
<i>Figura IV-5: Variação do Diagrama de Spot com a Variação do Plano Focal da Imagem do Sistema para Magnificação de 20x do M.E.</i> .....	121
<i>Figura IV-6: Seção Transversal da Função de Espalhamento Pontual do Sistema para Magnificação de 20x do M.E.</i> .....	122
<i>Figura IV-7: Simulação da imagem produzida pelo Sistema para Magnificação de 20x do M.E.</i> .....	123
<i>FIGURA IV-8: Aberração de Raio do Sistema Óptico para Magnificação de 30x do M.E.</i> .....	124
<i>FIGURA IV-9: Diferença de caminho optico do Sistema Óptico para Magnificação de 30x do M.E.</i> .....	124
<i>FIGURA IV-10: Aberração da Pupila de Entrada do Sistema Óptico para Magnificação de 30x do M.E.</i> .....	125
<i>Figura IV-11: Diagrama de Spot do Sistema para Magnificação de 30x do M.E.</i> .....	126
<i>Figura IV-12: Variação do Diagrama de Spot com a Variação do Plano Focal da Imagem do Sistema para Magnificação de 30x do M.</i> .....	126
<i>Figura IV-13: Seção Transversal da Função de Espalhamento Pontual do Sistema para Magnificação de 30x do M.E.</i> .....	127
<i>Figura IV-14: Simulação da imagem produzida pelo Sistema para Magnificação de 30x do M.E.</i> .....	128
<i>FIGURA IV-15: Aberração de Raio do Sistema Óptico para Magnificação de 63x do M.E.</i> .....	129
<i>FIGURA IV-16: Diferença de caminho optico do Sistema Óptico para Magnificação de 63x do M.E.</i> .....	129
<i>FIGURA IV-17: Aberração da Pupila de Entrada do Sistema Óptico para Magnificação de 63x do M.E.</i> .....	130
<i>Figura IV-18: Diagrama de Spot do Sistema para Magnificação de 63x do M.E.</i> .....	131
<i>Figura IV-19: Variação do Diagrama de Spot com a Variação do Plano Focal da Imagem do Sistema para Magnificação de 63x do M.E.</i> .....	131
<i>Figura IV-20: Seção Transversal da Função de Espalhamento Pontual do Sistema para Magnificação de 63x do M.E.</i> .....	132
<i>Figura IV-21: Simulação da imagem produzida pelo Sistema para Magnificação de 63x do M.E.</i> .....	133
<i>FIGURA IV-22: Aberração de Raio do Sistema Óptico para Magnificação de 136x do M.E.</i> ..	134
<i>FIGURA IV-23: Diferença de caminho optico do Sistema Óptico para Magnificação de 136x do M.E.</i> .....	134

<i>FIGURA IV-24: Aberração da Pupila de Entrada do Sistema Óptico para Magnificação de 136x do M.E. ....</i>	<i>135</i>
<i>Figura IV-25: Diagrama de Spot do Sistema para Magnificação de 136x do M.E. ....</i>	<i>135</i>
<i>Figura IV-26: Variação do Diagrama de Spot com a Variação do Plano Focal da Imagem do Sistema para Magnificação de 136x do M.E.....</i>	<i>136</i>
<i>Figura IV-27: Seção Transversal da Função de Espalhamento Pontual do Sistema para Magnificação de 136x do M.E.....</i>	<i>137</i>
<i>Figura IV-28: Simulação da imagem produzida pelo Sistema para Magnificação de 136x do M.E. ....</i>	<i>137</i>
<i>FIGURA IV-29: Aberração de Raio do Sistema Óptico para Magnificação de 205x do M.E... 138</i>	
<i>FIGURA IV-30: Diferença de caminho optico do Sistema Óptico para Magnificação de 205x do M.E. ....</i>	<i>139</i>
<i>FIGURA IV-31: Aberração da Pupila de Entrada do Sistema Óptico para Magnificação de 205x do M.E. ....</i>	<i>139</i>
<i>Figura IV-32: Diagrama de Spot do Sistema para Magnificação de 205x do M.E. ....</i>	<i>140</i>
<i>Figura IV-33: Variação do Diagrama de Spot com a Variação do Plano Focal da Imagem do Sistema para Magnificação de 205x do M.E.....</i>	<i>141</i>
<i>Figura IV-34: Seção Transversal da Função de Espalhamento Pontual do Sistema para Magnificação de 205x do M.E.....</i>	<i>141</i>
<i>Figura IV-35: Simulação da imagem produzida pelo Sistema para Magnificação de 205x do M.E. ....</i>	<i>142</i>

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Dados gerais do sistema de iluminação.</i>	37
<i>Tabela 2: Dados das superfícies de cada lente do sistema de iluminação.</i>	38
<i>Tabela 3: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de iluminação.</i>	38
<i>Tabela 4: Dados gerais do sistema de magnificação de 20x.</i>	41
<i>Tabela 5: Dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 20x.</i>	41
<i>Tabela 6: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de magnificação 20x.</i>	43
<i>Tabela 7: Dados gerais do sistema de magnificação de 30x.</i>	45
<i>Tabela 8: Dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 30x.</i>	45
<i>Tabela 9: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de magnificação de 30x.</i>	46
<i>Tabela 10: Dados gerais do sistema de magnificação de 63x.</i>	48
<i>Tabela 11: Dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 63x.</i>	49
<i>Tabela 12: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de magnificação de 63x.</i>	50
<i>Tabela 13: Dados gerais do sistema de magnificação de 136x.</i>	51
<i>Tabela 14: Dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 136x.</i>	52
<i>Tabela 15: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de magnificação de 136x.</i>	53
<i>Tabela 16: Dados gerais do sistema de magnificação de 205x.</i>	55
<i>Tabela 17: Dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 205x.</i>	55
<i>Tabela 18: Dados referentes aos pontos cardinais do sistema de magnificação de 205.</i>	56
<i>Tabela 19: Dados relativos as aberrações apresentadas pelo Zemax para os sistemas ópticos de magnificação do Microscópio Especular.</i>	69
<i>Tabela II.1: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de iluminação.</i>	97
<i>Tabela II.2: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 20x.</i>	99
<i>Tabela II.3: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 30x.</i>	103
<i>Tabela II.4: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 63x.</i>	107
<i>Tabela II.5: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 136x.</i>	110
<i>Tabela II.6: Detalhamento dos dados das superfícies de cada lente do sistema de magnificação de 205x.</i>	114
<i>Tabela III.1: Comprimento de onda utilizado para os cálculos dos sistemas de magnificação do Microscópio Especular.</i>	118
<i>Tabela III.2: Vidros e seus respectivos índices de refração utilizados nos sistemas de magnificação do Microscópio Especular.</i>	118

