

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-graduação em Física

Sabrina Ferreira dos Santos

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROSCOPIA
DE CAMPO EVANESCENTE POR
REFLEXÃO INTERNA TOTAL**

Belo Horizonte
2024

Sabrina Ferreira dos Santos

CARACTERIZAÇÃO DA MICROSCOPIA DE CAMPO EVANESCENTE POR REFLEXÃO INTERNA TOTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Agero Batista

Belo Horizonte

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S237c Santos, Sabrina Ferreira dos.

Caracterização da microscopia de campo evanescente por reflexão interna total / Sabrina Ferreira dos Santos. – 2024.

69 f. : il.

Orientador: Ubirajara Agero Batista.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Física.

Bibliografia: f. 56-59.

1. Microscopia de fluorescência. 2. Óptica. I. Título. II. Batista, Ubirajara Agero. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física.

CDU – 577.3 (043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ATA

ATA DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO DA 734ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA, DEFENDIDA POR SABRINA FERREIRA DOS SANTOS orientada pelo professor Ubirajara Agero Batista, para obtenção do grau de **Mestre, área de concentração Física**. Às 09:00 horas de quatro de outubro de dois mil e vinte e quatro reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores **Ubirajara Agero Batista** (Orientador - Departamento de Física/UFMG), **Ana Maria de Paula** (Departamento de Física/UFMG) e **Sebastião José Nascimento de Pádua** (Departamento de Física/UFMG), para dar cumprimento ao Artigo 37 do Regimento Geral da UFMG, submetendo a bacharel **SABRINA FERREIRA DOS SANTOS** à arguição de seu trabalho de dissertação, que recebeu o título de **"Caracterização da microscopia de campo evanescente por reflexão interna total."** A candidata fez uma exposição oral de seu trabalho durante aproximadamente 50 minutos. Após esta, os membros da comissão prosseguiram com a sua arguição, e apresentaram seus pareceres individuais sobre o trabalho, concluindo pela aprovação da candidata.

Belo Horizonte, 04 de outubro de 2024.

Prof. Ubirajara Agero Batista
Orientador da estudante
Departamento de Física/UFMG

Profª. Ana Maria de Paula
Departamento de Física/UFMG

Prof. Sebastião José Nascimento de Pádua
Departamento de Física/UFMG

Candidata: Sabrina Ferreira dos Santos

Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria de Paula, Professora do Magistério Superior**, em 04/10/2024, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sabrina Ferreira dos Santos, Usuário Externo**, em 04/10/2024, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ubirajara Agero Batista, Servidor(a)**, em 04/10/2024, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sebastião Jose Nascimento de Padua, Professor(a)**, em 28/10/2024, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3599146** e o código CRC **F0D251C3**.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Márcia e Adenir, ao meu irmão Isaac e à minha avô Tânia por todo apoio, carinho, amor, paciência e suporte durante todo este longo processo.

Agradeço ao meu orientador Bira pela orientação, paciência, apoio e entusiasmo nesses anos de pesquisa.

Agradeço ao professor Luiz Gustavo Cançado pelo auxílio no início da pesquisa.

Agradeço à professora Ana Maria pela disponibilização das microesferas fluorescentes.

Agradeço à professora Livia Siman pelo suporte e carinho.

Agradeço à professora Luciana Oliveira Andrade e ao seu aluno Ítallo Cecílio pelas amostras biológicas fornecidas.

Agradeço meus colegas de laboratório pelos conselhos, ajudas e risadas.

Agradeço à todos os meus amigos do Departamento de Física por me proporcionarem anos incríveis e por serem um ponto de apoio no meio das dificuldades.

Agradeço ao CNPq, Capes e Fapemig pelo apoio financeiro.

RESUMO

A microscopia de reflexão interna total, do inglês, *Total Internal Reflection Fluorescence* (TIRF), é uma poderosa técnica de microscopia de campo evanescente que se baseia na excitação de fluoróforos por meio de um campo evanescente gerado através do fenômeno de reflexão interna total de um feixe incidente na interface entre dois meios de diferentes índices de refração. Devido ao decaimento exponencial do campo evanescente com a distância, a principal aplicação do TIRF se dá no imageamento e estudo da dinâmica, de estruturas e fenômenos biológicos que ocorrem na região aderida da membrana plasmática celular em escala nanométrica por meio da análise da fluorescência excitada. Com o objetivo de se ter acesso à esta técnica e caracterizar os seus parâmetros físicos, no presente trabalho é apresentado um protocolo de montagem óptica para o acoplamento da funcionalidade da microscopia TIRF via objetiva em um microscópio invertido utilizando um laser diodo 488 nm. Este protocolo inclui um teste de qualidade que consiste em uma análise qualitativa de uma solução de microesferas fluorescentes que atesta a efetividade da montagem apresentada. A caracterização do sistema é feita seguindo um segundo protocolo experimental baseado no fenômeno de reflexão interna total frustrada que determinou e quantificou o comportamento exponencial do campo evanescente em função da distância. Esta caracterização permitiu, portanto, identificar os fatores capazes de reduzir o fenômeno de espalhamento intrínseco a esses sistemas e analisar a precisão das medidas dos ângulos de incidência do feixe de excitação.

Palavras-chave: TIRF, Campo Evanescente, Reflexão Interna Total.

ABSTRACT

The Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) is a powerful evanescent field microscopy technique based on excitation of fluorophores by an electromagnetic evanescent field generated through the phenomenon of total internal reflection of an excitation light beam incident on the interface of two media of different refractive index. Due to the exponential decay of this evanescent field with distance, TIRF's primary application is based on the visualization and study of the dynamics, the structures and other biological phenomena that occur on the adhered cells' plasma membrane in nanometric scale through the fluorescence analysis. In order to have access to this technique and characterize its physical parameters, in this work is presented a setup protocol for a homemade 'through the objective' TIRF using a blue diode laser at 488 nm coupled to the rear port of an inverted microscope. This protocol includes a quality test for this TIRF setup that consists in a qualitative analysis of a fluorescence microbeads solution which attests its effectiveness. The system characterization was performed following a second protocol based on the phenomena of frustrated total internal reflection that determines the evanescent field behavior with distance. This characterization, therefore, made possible the identification of variables capable of reducing the light scattering intrinsic to the setup and analyse the accuracy of incident angles measurements.

Keywords: TIRF, Evanescent field, Total internal reflection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Comparação entre imagens obtidas através das técnicas de Epi-fluorescência e TIRF. Imagem retirada de [8].	13
Figura 2 – Comparação entre imagens obtidas através das técnicas de Epi-fluorescência e TIRF. Imagem retirada de [24].	15
Figura 3 – Representação da propagação de uma onda incidente sobre a interface entre dois meios de diferentes propriedades ópticas no plano xz	18
Figura 4 – Representação da onda evanescente gerada através da reflexão interna total	20
Figura 5 – Onda incidente sob um ângulo $\theta_I > \theta_C$	21
Figura 6 – Ilustração do princípio básico de funcionamento do TIRF via prisma	22
Figura 7 – Montagem esquemática da microscopia TIRF em um microscópio padrão.	24
Figura 8 – Montagem esquemática da microscopia TIRF em um microscópio invertido com o prisma posicionado sobre a amostra.	25
Figura 9 – Montagem esquemática da microscopia TIRF em um microscópio invertido com o prisma posicionado sob a amostra.	27
Figura 10 – Esquema de iluminação do <i>BFP</i> da objetiva no regime de reflexão interna total.	28
Figura 11 – Montagem esquemática do TIRF via objetiva.	30
Figura 12 – Esquematização da abertura angular máxima de uma objetiva.	32
Figura 13 – Esquema do trajeto dos raios emergentes de uma amostra após serem focalizados no BFP da objetiva.	33
Figura 14 – Esquematização do trajeto dos raios focalizados no BFP da objetiva por uma lente externa.	33
Figura 15 – Montagem experimental do TIRF via objetiva.	35
Figura 16 – Representação do filtro espacial utilizado na montagem experimental do TIRF.	36
Figura 17 – Representação da diferença dos ângulos de convergência de um feixe elíptico em relação ao plano da área de seção retangular de um laser diodo.	36
Figura 18 – Representação do perfil de intensidade do feixe em cada etapa do filtro espacial.	37
Figura 19 – Representação da geometria referente à expansão do feixe.	37
Figura 20 – Montagem experimental utilizada para a medição do campo evanescente.	39
Figura 21 – Espectro de transmissão do filtro de emissão utilizado.	42
Figura 22 – Resultados do teste de qualidade do TIRF.	43

Figura 23 – Representação geométrica dos ângulos utilizados para estimar o ângulo de incidência na interface lamínula/ar.	45
Figura 24 – Gráfico da intensidade em função da distância para três intervalos angulares distintos: $\theta \approx \theta_{C'}$, $\theta_{C'} < \theta < \theta_{M'}$ e $\theta \approx \theta_{M'}$	46
Figura 25 – Representação da posição dos feixes sob os ângulos: (1) Ângulo crítico $\theta_{C'}$, (2) $\theta_{C'} < \theta < \theta_{M'}$ e (3) $\theta_{M'}$	48
Figura 26 – Comparação entre as regiões focais de tamanhos diferentes e sua relação com os ângulos de incidência.	49
Figura 27 – Alargamento do feixe gaussiano em função da distância z do eixo de propagação.	50
Figura 28 – Mioblastos cardíacos, H9c2, marcados com <i>Alexa Fluor 488</i> iluminados via (A) epifluorescência e (B) TIRF.	54
Figura 29 – Esquematização geométrica referente ao feixe de incidência em um prisma equilátero.	60
Figura 30 – Esquematização geométrica referente ao feixe de incidência em um prisma reto.	61
Figura 31 – Esquematização geométrica referente ao feixe de incidência em um prisma trapezoidal de 60°	62
Figura 32 – Esquematização geométrica referente à medição do feixe de incidência em um prisma reto.	63
Figura 33 – Esquematização geométrica referente à medição do ângulo β	64
Figura 34 – Esquematização geométrica referente ao intervalo $\beta < 0$	65
Figura 35 – Esquematização geométrica do plano Σ correspondente à uma abertura circular de raio a cujo padrão de difração é observado em um plano σ	66
Figura 36 – Representação da curva de intensidade e seu respectivo disco de Airy.	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE REFLEXÃO INTERNA TOTAL	15
2.1	Princípios teóricos da microscopia de reflexão interna total	16
3	MONTAGENS ÓPTICAS PARA ACESSO AO TIRF: UMA REVISÃO	22
3.1	TIRF via prisma	22
3.1.1	TIRF via prisma em um microscópio padrão	23
3.1.2	TIRF via prisma em um microscópio invertido: prisma sobre a amostra . . .	24
3.1.3	TIRF via prisma em um microscópio invertido: prisma sob a amostra . . .	27
3.2	TIRF via objetiva	28
3.2.1	Abertura numérica	31
3.2.2	O <i>back focal plane</i> da objetiva	32
4	MONTAGEM EXPERIMENTAL: TIRF VIA OBJETIVA	34
4.1	Montagem experimental de um TIRF via objetiva	34
4.2	Medição da profundidade do campo evanescente	39
5	CARACTERIZAÇÃO DA MONTAGEM ÓPTICA: TIRF VIA OBJE- TIVA	41
5.1	Qualidade do TIRF	41
5.2	Caracterização do campo evanescente	44
5.2.1	Limites do intervalo angular medido através de um prisma sob o regime de TIRF	47
5.2.2	O espalhamento do feixe incidente	49
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICES	59
	APÊNDICE A – ÂNGULO MÁXIMO DE INCIDÊNCIA	60
A.1	Prisma Equilátero	60
A.2	Prisma Reto	61

A.3	Prisma Trapezoidal	62
	APÊNDICE B – DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE INCIDÊNCIA PARA A MEDIÇÃO DA DISTÂNCIA DE PROFUNDIDADE DO CAMPO EVANESCENTE	63
	APÊNDICE C – DETERMINAÇÃO DA CINTURA DE UM FEIXE FOCALIZADO POR UMA LENTE	66

1 INTRODUÇÃO

As células são tratadas como estruturas volumétricas em que tanto as suas membranas inferiores e superiores quanto o seu interior são objetos de pesquisa de bastante interesse. A membrana plasmática, em particular, se destaca por ser uma estrutura que atua como uma barreira entre os meios intra e extracelular coordenando, portanto, a troca de moléculas e substâncias entre a célula e o meio que a envolve. É uma vez que as células se demonstram sensíveis à estímulos externos, mudanças morfológicas nas estruturas das membranas são indicativos de alterações biológicas no sistema. Estas alterações, por sua vez, podem indicar mudanças na composição molecular da membrana devido à ação de um fármaco, à presença de infecções causadas por um patógeno e à ocorrência de processos celulares como a exocitose e endocitose [19, 24, 27, 32].

Por conseguinte, o estudo das mudanças biomecânicas da membrana celular surge da importância de compreender, com maior riqueza de detalhes, os processos biológicos ocorridos em seu interior e em regiões próximas a esta estrutura sob determinadas condições e fenômenos. Além disso, visa-se a caracterização e compreensão dos mecanismos pelos quais alguns patógenos infectam determinadas células [1, 2]. Em outras palavras, o melhor entendimento das mudanças morfológicas leva ao avanço em pesquisas envolvendo diagnósticos e tratamentos menos invasivos e mais eficazes de patologias, a formulação de fármacos cujos efeitos colaterais são menos agressivos e a caracterização detalhada de fenômenos biológicos, o que permite um melhor entendimento e descrição de estruturas e processos celulares [3, 18].

A microscopia de fluorescência é amplamente utilizada para o estudo da membrana celular, uma vez que se tem o uso de fluoróforos que possuem a capacidade de atuar como marcadores de estruturas e moléculas biológicas, que não seriam distinguidas ou identificadas com outras técnicas de microscopia. Entretanto, a obtenção e o tratamento de imagens de estruturas celulares e processos biológicos que se dão na membrana plasmática podem apresentar certas dificuldades quando as principais técnicas de microscopias de fluorescência são utilizadas. Isso se deve ao fato de que estas técnicas têm a capacidade de captar a luminescência de todo o volume da amostra, o que pode levar ao obscurecimento de detalhes das regiões de interesse, uma vez que tanto a fluorescência da própria célula quanto a do meio extracelular é excitada, e assim certas estruturas e processos podem ser ofuscados [12, 24]. Dessa forma, o imageamento de tais estruturas e processos requer o uso de técnicas mais específicas, que permitem uma melhor visualização de detalhes dos fenômenos biológicos sob investigação. Dentre as possíveis técnicas a serem consideradas, a microscopia de fluorescência de reflexão interna total se apresenta como uma opção viável,

prática e otimista em relação à análise das estruturas celulares aderidas.

A microscopia de fluorescência de reflexão interna total, do inglês, *total internal reflection fluorescence* (TIRF), é uma técnica baseada na geração de um campo eletromagnético evanescente através do fenômeno de reflexão interna total de um feixe incidente entre duas interfaces de diferentes índices de refração [19]. Devido ao comportamento evanescente do campo eletromagnético gerado nesta interface, é possível obter uma visualização mais detalhada, quando comparada com técnicas de microscopia de fluorescência tradicionais, de estruturas e fenômenos biológicos que ocorrem na região aderida da membrana, e que outrora seriam obscurecidos pela fluorescência do volume da amostra [22], uma vez que somente os marcadores biológicos localizados a algumas centenas de nanômetros em relação à interface da amostra seriam excitados por este campo evanescente, como exemplificado na figura 1.

A popularização desta técnica vem em um crescente ao longo dos anos devido: (1) a sua grande capacidade de visualizar detalhes de estruturas da membrana em tempo real; (2) à possibilidade de combinar o TIRF com outras técnicas de microscopia e (3) à acessibilidade à esta técnica. Esta acessibilidade, por sua vez, muito se deve ao trabalho de Daniel Axelrod, um pesquisador responsável por desenvolver e aprimorar técnicas de microscopia de fluorescência. Em muitos dos seus trabalhos são discutidas uma diversificação de montagens ópticas para a construção de um sistema TIRF e suas aplicações biológicas [2, 9, 13, 34]. Dentre as principais aplicações biológicas está a identificação e caracterização de regiões de contato entre a célula e o substrato sobre o qual ela está colocada, sendo estas regiões de grande interesse biológico [7]; o monitoramento de processos biológicos ao longo do tempo, visto que o TIRF minimiza o foto-dano sofrido pela amostra [35]; a análise dos processos de exocitose, posto que o TIRF permite a visualização e caracterização das moléculas expelidas [21, 26] e o estudo de moléculas únicas [10, 20].

Toda a aplicação do TIRF se baseia na sua principal característica: a geração de um campo eletromagnético evanescente na interface onde a amostra se encontra.

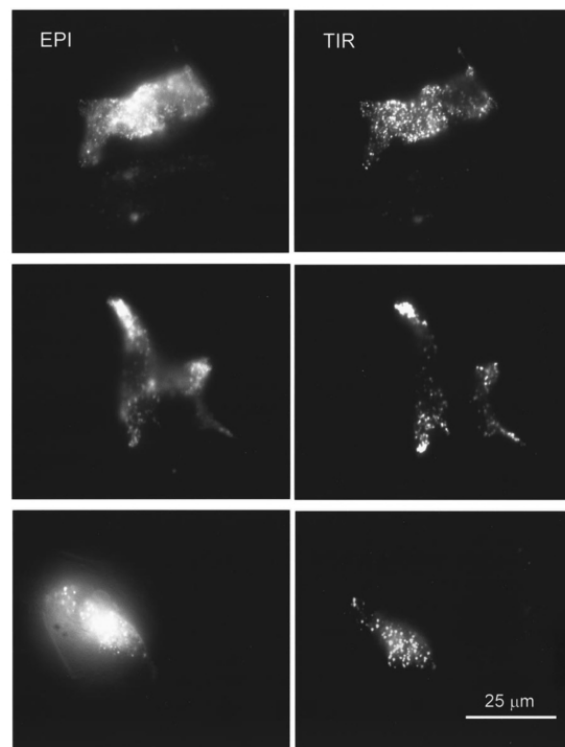


Figura 1 – Comparação entre imagens obtidas através das técnicas de Epi-fluorescência e TIRF. Imagem retirada de [8].

Consequentemente, a caracterização deste campo torna-se desejável quando o intuito é obter resultados quantitativos de parâmetros mecânicos das estruturas analisadas. A caracterização deste campo evanescente é feita através da obtenção dos valores da sua respectiva distância de penetração d , ou seja, medindo o quanto este campo eletromagnético gerado penetra na amostra. Estes valores de d costumam ser estimados através de medições do ângulo de incidência do feixe sobre a amostra [19,36]. Entretanto, os valores dos ângulos de incidência não são medições triviais a serem feitas, uma vez que podem aumentar a complexidade das montagens experimentais e não possuir uma precisão satisfatória. Outra forma de se caracterizar a sua distância de penetração é realizando uma medição direta do perfil de intensidade do campo gerado. Estas medições, por sua vez, também apresentam complicações: (1) alteram o *setup* inicial utilizado para os experimentos utilizando a microscopia TIRF [28]; (2) possuem dificuldades e até mesmo impossibilidades de medições feitas em meio aquoso [23]; (3) alteram a distância de profundidade d do campo evanescente ao qual as amostras celulares são submetidas ao alterar o meio onde estas medições são feitas [33] e (4) requerem preparação de amostras rebuscadas utilizando técnicas como litografia de feixes e *Atomic Force Microscopy* (AFM) [5,6,16,25]. Além das complicações citadas, os campos eletromagnéticos medidos não são campos evanescentes puros, uma vez que parte da luz é espalhada tanto pela própria montagem óptica quanto por variações do índice de refração dentro da amostra analisada [4,12]. Na literatura, encontra-se diversos trabalhos que buscam caracterizar o padrão de intensidade do campo eletromagnético total sob o regime do TIRF [4,16,17,25] e quantificar o espalhamento devido ao campo evanescente e sua respectiva distância de profundidade efetiva além de identificar as fontes de espalhamento deste campo [5,6].

Isto posto, neste trabalho será discutido a montagem experimental de um sistema TIRF utilizando uma objetiva de alta abertura numérica assim como seu respectivo teste a fim de averiguar a qualidade da montagem. Também será abordada a montagem óptica para medição da distância de profundidade do campo evanescente e a sua relação com o ângulo de incidência do feixe de excitação. Nesta etapa não é feito o uso de nenhuma amostra aquosa, o que permite quantificar o espalhamento da luz sob o regime de reflexão interna total devido ao sistema de montagem. No capítulo 2 será apresentada a descrição matemática e os princípios físicos que regem o funcionamento do TIRF, e que devem ser considerados para melhor compreensão e caracterização da técnica. No capítulo 3 serão abordadas as principais montagens do TIRF via prisma e via objetiva. Tendo posto todo o aparato teórico do TIRF, os detalhes da montagem óptica para se ter acesso à esta técnica bem como a montagem óptica utilizada para a medição da distância de profundidade do campo evanescente gerado pelo fenômeno de reflexão interna total serão discutidos no capítulo 4. Já no capítulo 5, tanto os resultados dos testes que indicam a confiabilidade da montagem quanto a relação da profundidade do campo evanescente com o ângulo de incidência serão apresentados e discutidos.

2 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE REFLEXÃO INTERNA TOTAL

A microscopia de fluorescência de reflexão interna total (*total internal reflection fluorescence microscopy*) ou TIRF, é uma técnica óptica amplamente utilizada no campo da biologia celular e da bioquímica para o estudo de dinâmica de superfícies de células e de biomoléculas assim como a cinética bioquímica de tais estruturas biológicas [9].

Como antes dito, esta técnica se baseia na excitação de fluoróforos através de um campo eletromagnético evanescente gerado a partir da reflexão interna total do feixe de excitação. Esta reflexão interna total ocorre na interface entre um sólido, a lamínula de vidro, e um meio aquoso, a amostra biológica a ser analisada [9, 19]. O campo eletromagnético evanescente gerado se propaga paralelamente a interface e possui uma profundidade d que decai exponencialmente com a distância em relação a lamínula, como será demonstrado na seção seguinte. Dessa forma, o TIRF permite a análise de dinâmicas e estruturas aderidas na lamínula, como a membrana plasmática e o citoesqueleto de células.

Além do TIRF há outras técnicas de microscopia de fluorescência voltadas para o estudo de parâmetros biomecânicos das células. Logo, é comum se questionar qual a vantagem do TIRF frente a essas outras técnicas, como a epifluorescência. A sua vantagem se dá no fato de que o TIRF permite: (1) a visualização de imagens tanto com uma menor interferência da luminescência de fundo quanto com um alto contraste, o que possibilita a análise de estruturas que outrora seriam obscurecidas por esta luminescência provinda do volume

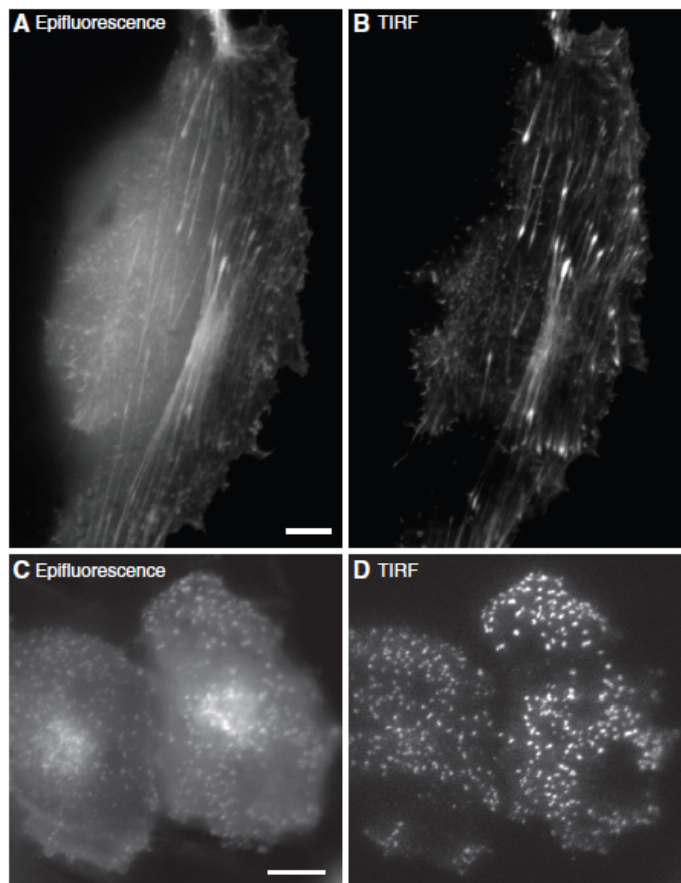


Figura 2 – Comparação entre imagens obtidas através das técnicas de Epi-fluorescência e TIRF. Imagem retirada de [24].

da amostra, como mostrado na figura 2, e (2) um menor tempo e uma menor área de exposição à luz, o que reduz o dano à amostra [9, 24].

Tendo em vista estas vantagens, o acesso à esta técnica torna-se um ponto de interesse. Este acesso pode ser obtido tanto por microscópios comerciais que já possuem a funcionalidade da microscopia TIRF acoplada em seu aparato quanto através da montagem de um sistema óptico acoplado a um microscópio, o que é chamado de TIRF experimental. Esta segunda opção apresenta certos benefícios frente à primeira por permitir uma maior liberdade de escolha dos parâmetros do sistema, como o comprimento de onda do feixe incidente e a combinação do TIRF com outras técnicas de microscopia. De forma geral, há duas opções de montagem do TIRF: a montagem através de uma objetiva e a montagem através de um prisma. No próximo capítulo será discutido ambas as montagens assim como as suas vantagens e desvantagens.

Portanto, é necessário questionar e entender o que faz esta técnica ser tão importante. Para isso, é preciso compreender a física por trás da microscopia de fluorescência de reflexão interna total.

2.1 Princípios teóricos da microscopia de reflexão interna total

Como dito, a microscopia de fluorescência de reflexão interna total ocorre devido a geração de um campo eletromagnético evanescente. Para melhor entender o que é este campo e como ele é produzido, é preciso primeiro compreender a dinâmica e as características das ondas eletromagnéticas, as quais são descritas pelas equações de Maxwell:

$$\begin{aligned}
 \text{Lei de Gauss : } \nabla \cdot \mathbf{E} &= \frac{\rho}{\epsilon} \\
 \text{Lei de Gauss para o magnetismo : } \nabla \cdot \mathbf{B} &= 0 \\
 \text{Lei de Faraday : } \nabla \times \mathbf{E} &= -\frac{d\mathbf{B}}{dt} \\
 \text{Lei de Ampère – Maxwell : } \nabla \times \mathbf{B} &= \mu\epsilon\frac{d\mathbf{E}}{dt} + \mu\mathbf{J}
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

Para meios sem cargas livres e sem correntes, as equações de Maxwell são da forma:

$$\begin{aligned}
 \text{Lei de Gauss : } \nabla \cdot \mathbf{E} &= 0 \\
 \text{Lei de Gauss para o magnetismo : } \nabla \cdot \mathbf{B} &= 0 \\
 \text{Lei de Faraday : } \nabla \times \mathbf{E} &= -\frac{d\mathbf{B}}{dt} \\
 \text{Lei de Ampère – Maxwell : } \nabla \times \mathbf{B} &= \mu\epsilon\frac{d\mathbf{E}}{dt}
 \end{aligned} \tag{2.2}$$

A partir destas equações pode-se obter as equações de onda para o campo elétrico e para o campo magnético. Para tal demonstração, será usada a seguinte identidade utilizando um vetor genérico $\mathbf{A}$:

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{A}) = \nabla(\nabla \cdot \mathbf{A}) - \nabla^2 \mathbf{A} \quad (2.3)$$

Aplicando 2.2 em 2.3 para o campo elétrico $\mathbf{E}$ tem-se:

$$\begin{aligned} \nabla \times (\nabla \times \mathbf{E}) &= \nabla(\nabla \cdot \mathbf{E}) - \nabla^2 \mathbf{E} \\ \nabla \times \left(\mu \epsilon \frac{d\mathbf{B}}{dt} \right) &= \nabla^2 \mathbf{E} \\ \nabla^2 \mathbf{E} &= \mu \epsilon \frac{d^2 \mathbf{E}}{dt^2} \end{aligned} \quad (2.4)$$

Fazendo o mesmo para o campo magnético $\mathbf{B}$ tem-se:

$$\begin{aligned} \nabla \times (\nabla \times \mathbf{B}) &= \nabla(\nabla \cdot \mathbf{B}) - \nabla^2 \mathbf{B} \\ \nabla \times \left(\mu \epsilon \frac{d\mathbf{E}}{dt} \right) &= -\nabla^2 \mathbf{B} \\ \nabla^2 \mathbf{B} &= \mu \epsilon \frac{d^2 \mathbf{B}}{dt^2} \end{aligned} \quad (2.5)$$

As equações de onda para os campos $\mathbf{E}$ e $\mathbf{B}$ são, portanto:

$$\nabla^2 \mathbf{E} = \mu \epsilon \frac{d^2 \mathbf{E}}{dt^2} \quad \nabla^2 \mathbf{B} = \mu \epsilon \frac{d^2 \mathbf{B}}{dt^2} \quad (2.6)$$

Uma das possíveis soluções para as equações acima são as ondas planas representadas por:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \mathbf{E}'_0 e^{i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)} \quad \mathbf{B}(\mathbf{r}) = \mathbf{B}'_0 e^{i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)} \quad (2.7)$$

Em que $\mathbf{r}$ é o vetor posição, $\mathbf{k}$ é o vetor de onda e $\mathbf{B}'_0 = (\mu\omega)^{(-1)} \mathbf{k} \times \mathbf{E}$. Suponha que a onda plana em questão incida sobre a interface entre dois meios cujas propriedades ópticas se diferenciam entre si, como indica a figura 3. Sabe-se que parte da onda será refletida, parte refratada e parte transmitida e o campo elétrico correspondente a cada uma dessas ondas é dado por [15]:

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_I(\mathbf{r}) &= \mathbf{E}'_{0I} e^{i(\mathbf{k}_I \mathbf{r} - \omega t)} \\ \mathbf{E}_R(\mathbf{r}) &= \mathbf{E}'_{0R} e^{i(\mathbf{k}_R \mathbf{r} - \omega t)} \\ \mathbf{E}_T(\mathbf{r}) &= \mathbf{E}'_{0T} e^{i(\mathbf{k}_T \mathbf{r} - \omega t)} \end{aligned} \quad (2.8)$$

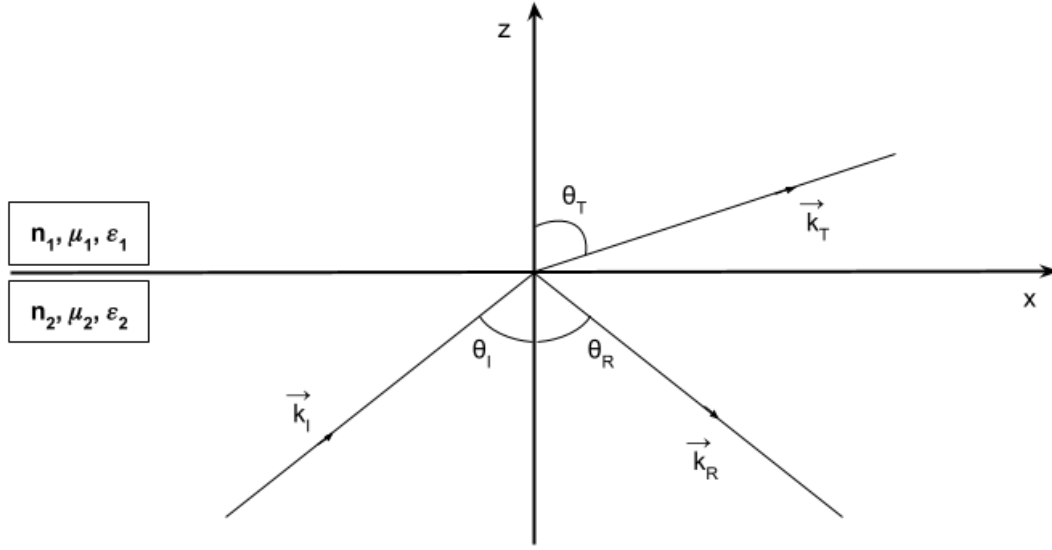


Figura 3 – Representação da propagação de uma onda incidente sobre a interface entre dois meios de diferentes propriedades ópticas no plano xz .

Na interface xz onde as ondas se encontram e onde $y = 0$, tem-se:

$$\mathbf{E}_{0I} + \mathbf{E}_{0R} = \mathbf{E}_{0T} \quad (2.9)$$

Somado a isso, para que as condições de contorno sejam válidas em todo e em qualquer ponto da interface entre os dois meios e em qualquer instante de tempo, é aplicada a seguinte relação:

$$(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r})_I = (\mathbf{k} \cdot \mathbf{r})_R = (\mathbf{k} \cdot \mathbf{r})_T \quad (2.10)$$

Essa relação implica que os vetores $\mathbf{k}_I$, $\mathbf{k}_R$, $\mathbf{k}_T$ são coplanares [15]. Além disso, ao considerar os ângulos entre os feixes e a normal à interface, a relação 2.10 pode ser escrita como:

$$\mathbf{k}_I \sin(\theta_I) = \mathbf{k}_R \sin(\theta_R) = \mathbf{k}_T \sin(\theta_T) \quad (2.11)$$

Como $\mathbf{k}_I = \mathbf{k}_R$, uma vez que se encontram no mesmo meio, tem-se:

$$\theta_I = \theta_R \quad (2.12)$$

A relação acima é conhecida como lei da reflexão [15].

Uma outra importante relação pode ser obtida ao considerar o módulo do vetor $\mathbf{k}$ definido como:

$$k = \frac{\omega}{v} \quad (2.13)$$

Em que v é a velocidade da onda no meio e $\omega = 2\pi f$ é a frequência angular de oscilação. A partir destas relações tem-se que a razão entre os vetores de onda dos dois meios é dada por:

$$\frac{k_T}{k_I} = \frac{\omega/v_T}{\omega/v_I} = \frac{1/v_T}{1/v_I} = \frac{c/v_T}{c/v_I} = \frac{n_1}{n_2} = n \quad (2.14)$$

Em que n_1, n_2 e n são os índices de refração do meio 1, do meio 2 e o índice de refração relativo, respectivamente. Frente a isso e partindo da relação 2.11 tem-se:

$$\frac{k_T}{k_I} = \frac{\sin(\theta_I)}{\sin(\theta_T)} = \frac{n_1}{n_2} = n \quad (2.15)$$

Ou

$$n_2 \sin(\theta_I) = n_1 \sin(\theta_T) \quad (2.16)$$

A relação acima é conhecida como Lei de Snell [15].

Com base no que foi visto acima, pode-se entender como o TIRF funciona. A essência desta técnica reside no campo evanescente gerado devido a reflexão interna total [9, 19, 24]. Para entender melhor este campo evanescente, é preciso considerar a onda transmitida pela interface entre os dois meios. Portanto, considere:

$$\mathbf{E}_T(\mathbf{r}) = \mathbf{E}'_{0T} e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} - \omega t)} \quad (2.17)$$

Ainda de acordo com a figura 3, a interface se encontra no plano xy de modo que $k_y = 0$. Dessa forma, o produto vetorial $\mathbf{k}_T \cdot \mathbf{r}$ é dado por:

$$\mathbf{k}_T \cdot \mathbf{r} = k_{Tx}x + k_{Tz}z = k_T \sin(\theta_T)x + k_T \cos(\theta_T)z$$

$$\mathbf{k}_T \cdot \mathbf{r} = k_T \sin(\theta_T)x + k_T \sqrt{1 - \sin^2(\theta_T)}z \quad (2.18)$$

$$\mathbf{k}_T \cdot \mathbf{r} = (n_1)^{-1} k_T (n_2 \sin(\theta_I)x + \sqrt{(n_1)^2 - (n_2)^2 \sin^2(\theta_I)}z)$$

Lembrando que o módulo do vetor de onda no vácuo, neste caso, é dado por $k = k_T/n_1$, tem-se:

$$\mathbf{k}_T \cdot \mathbf{r} = k(n_2 \sin(\theta_I)x + \sqrt{(n_1)^2 - (n_2)^2 \sin^2(\theta_I)}z) \quad (2.19)$$

Portanto, o campo elétrico correspondente à onda transmitida em 2.8 pode ser reescrito como [15]:

$$\mathbf{E}_T(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_{0T} \exp(ikz\sqrt{(n_1)^2 - (n_2)^2 \sin^2(\theta_I)}) \quad (2.20)$$

Em que $\mathbf{E}_{0T} = \mathbf{E}'_{0T} \exp(ikn_2 \sin(\theta_I)x - i\omega t)$ é um fator de fase que descreve a amplitude do campo elétrico. No regime de reflexão interna total, tem-se que $(n_1)^2 - (n_2)^2 \sin^2(\theta_I) < 0$, ou seja, a raiz da expressão 2.20 é uma raiz imaginária, o que fornece um campo elétrico da forma:

$$\mathbf{E}_T(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_{0T} \exp(-kz\sqrt{(n_2)^2 \sin^2(\theta_I)^2 - (n_1)^2}) \quad (2.21)$$

Em outras palavras, o campo elétrico é descrito em termos de uma exponencial decrescente da forma $e^{-z/d'}$ sendo que o fator d' representa o quanto o campo elétrico penetra em z (na interface entre os dois meios). Já o fator de fase na expressão do campo elétrico, $\mathbf{E}_{0T}$, indica que a onda evanescente pode ser descrita como um conjunto de superfícies de fase constante que se deslocam paralelamente à interface [15], como mostra a figura 4.

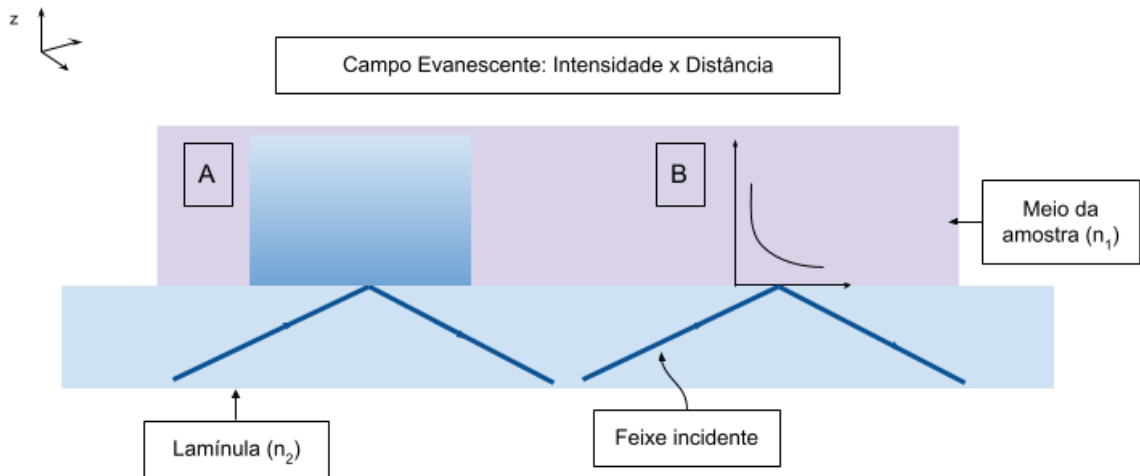


Figura 4 – Representação da onda evanescente gerada através da reflexão interna total de um feixe incidente na interface entre um meio sólido, a lamínula de vidro de $n = n_2$, e um meio aquoso, a amostra biológica de $n = n_1$, de modo que $n_2 > n_1$. Em (A) tem-se o esquema da variação da intensidade do campo evanescente em função da distância. Em (B) há a representação do gráfico da intensidade desse campo em função da distância.

Muitas das medidas envolvendo o campo elétrico dependem dos seus respectivos valores de intensidade I . Esta intensidade, por sua vez, obedece a relação $I \propto |\mathbf{E}|^2$ de forma que:

$$I = I_0 e^{-z/d} \quad (2.22)$$

Em que a profundidade do campo evanescente $d = d'/2$ é dada por:

$$d = \frac{\lambda/4\pi}{\sqrt{(n_2 \sin(\theta_I))^2 - (n_1)^2}} \quad (2.23)$$

É importante pontuar que o ângulo de incidência θ_I em 2.23 precisa ser maior do que o ângulo crítico θ_C , uma vez que a análise foi feita sob o regime de reflexão interna total, como mostra a figura 5.

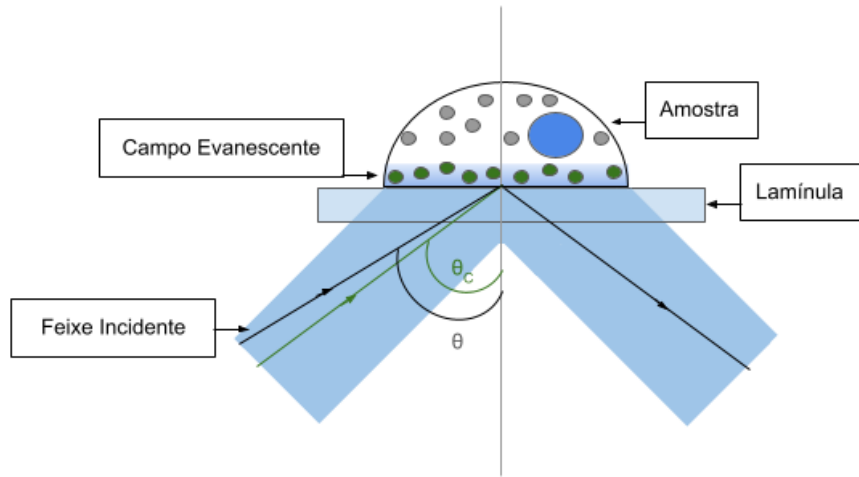


Figura 5 – Representação da incidência de uma onda eletromagnética em uma amostra biológica sob um ângulo $\theta_I > \theta_C$.

Este ângulo crítico θ_C é obtido a partir da Lei de Snell 2.16:

$$\theta_C = \arcsin(n_1/n_2) \quad (2.24)$$

3 MONTAGENS ÓPTICAS PARA ACESSO AO TIRF: UMA REVISÃO

Estabelecidos os princípios físicos que descrevem o TIRF, o próximo passo é o acesso à esta técnica. Na literatura são abordadas diversas formas de se ter acesso à microscopia de TIRF. Estas formas se classificam em: TIRF comercial, em que os microscópios adquiridos já possuem esta técnica acoplada e TIRF experimental, em que se é feita uma montagem óptica a fim de acoplar esta funcionalidade a um microscópio. Dentro destas duas classificações o acesso à técnica é dividido em: TIRF via prisma, em que a reflexão interna total do feixe incidente é gerada na interface prisma/lamínula, e TIRF via objetiva em que a excitação e a coleta da fluorescência é feita através de uma objetiva colocada em contato óptico com uma lamínula de vidro em um microscópio invertido. Nas seções seguintes serão discutidas as configurações ópticas que possibilitam o acesso ao TIRF experimental.

3.1 TIRF via prisma

Nestas montagens, um prisma é utilizado para gerar o fenômeno de reflexão interna total na interface prisma/amostra, como mostrado na figura 6.

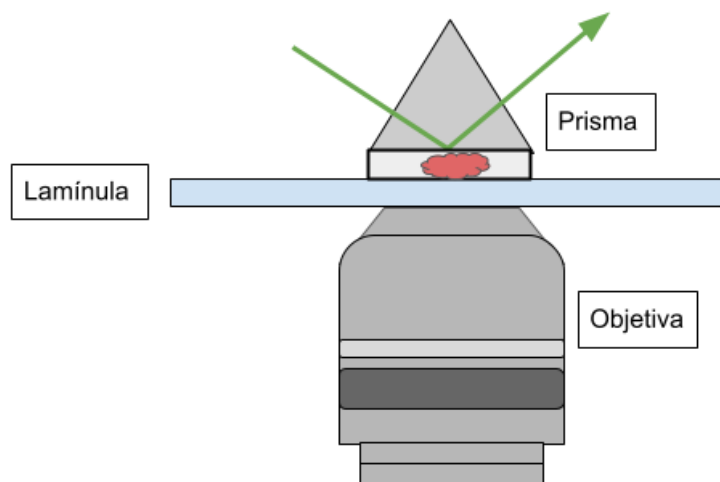


Figura 6 – Ilustração do princípio básico de funcionamento da excitação de luminescência do TIRF através de um prisma. O feixe incide na interface prisma/lamínula e excita a amostra em sua superfície superior.

As principais características desta montagem são:

- Produz campos evanescentes mais puros em relação ao TIRF via objetiva devido ao mínimo espalhamento da luz que a técnica permite atingir;
- Difícil acesso à amostra durante a utilização da técnica;
- Menor flexibilidade de escolha dos ângulos de incidência.

As montagens podem ser realizadas com o prisma acima da amostra, o que só pode ser feito em um microscópio invertido, ou com o prisma abaixo da amostra, sendo que nesta opção tanto um microscópio padrão quanto um invertido podem ser utilizados. As características dessa montagem bem como suas vantagens e desvantagens são apresentadas a seguir.

3.1.1 TIRF via prisma em um microscópio padrão

Nesta configuração, mostrada na figura 7, a reflexão interna total do feixe incidente ocorre na interface prisma/amostra. Este prisma, em formato trapezoidal ou hemisférico, é montado sobre o condensador do microscópio e posto em contato óptico com o porta-amostras através do óleo de imersão. A excitação da fluorescência é feita por uma fonte de laser incidente na porta do microscópio destinada à epifluorescência de forma a utilizar a própria óptica do sistema para direcionar o feixe até a amostra. O controle do ângulo de incidência para a excitação da amostra é feito ao posicionar uma lente convergente no caminho óptico do feixe, externo ao microscópio. Por fim, a coleta da imagem é feita através de uma objetiva de imersão à água mergulhada na solução tampão de interesse.

Esta montagem, apesar de conveniente, apresenta alguns pontos a serem considerados. Dentre os pontos negativos, destaca-se:

- Há pouca liberdade de escolha do ângulo de incidência devido ao uso do prisma trapezoidal, uma vez que o prisma permite o acesso a um intervalo angular discreto e não a um contínuo. Entretanto, além do uso de um prisma esférico, uma outra opção de contorno para este problema seria o uso de primas trapezoidais de formatos diversos, o que permite uma maior liberdade angular;
- As objetivas precisam ter uma grande distância de trabalho, uma vez que estão posicionadas do lado oposto da região onde ocorre a geração do campo evanescente.

Por outro lado, há certas vantagens referentes à esta montagem, como:

- Há uma grande praticidade ao utilizar o caminho óptico do próprio microscópio para a montagem experimental;

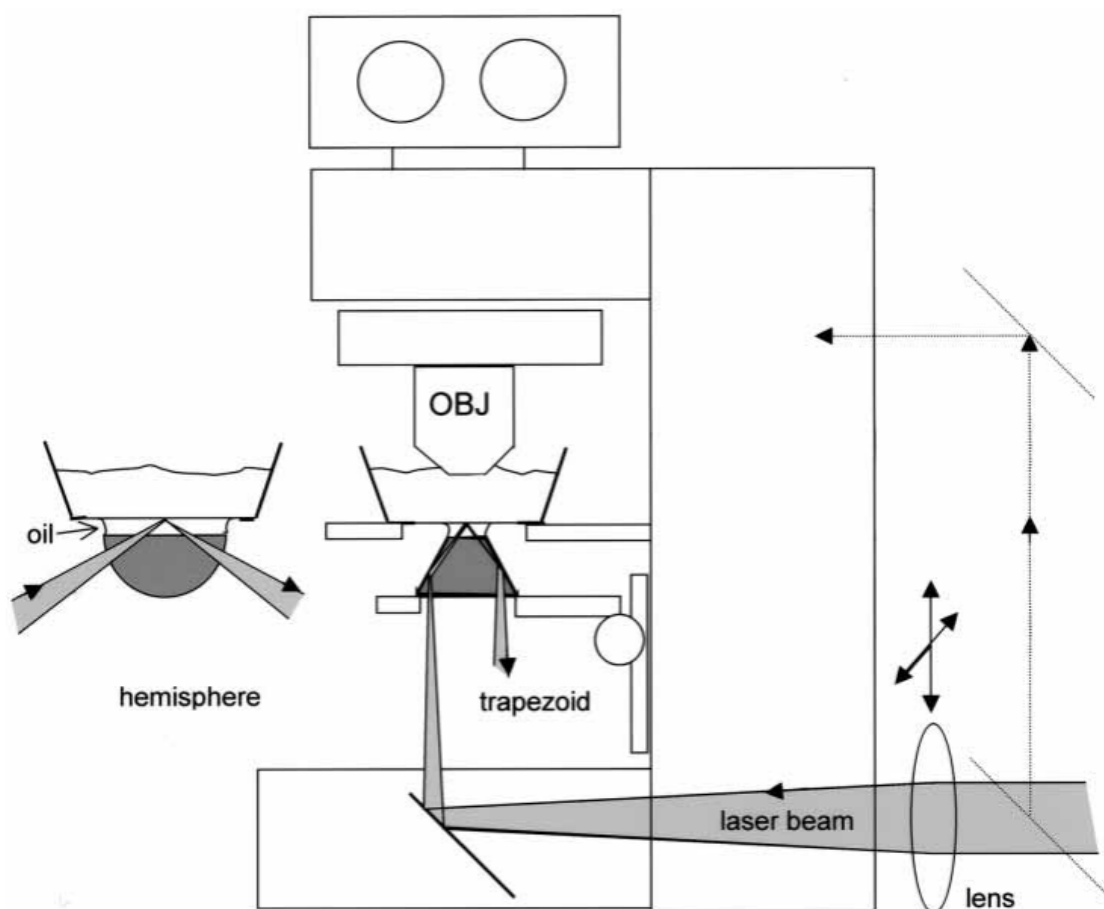


Figura 7 – Montagem esquemática da microscopia TIRF em um microscópio padrão. Um prisma trapezoidal (ou hemisférico) é posto em contato óptico com o porta-amostras via óleo de imersão. O feixe de excitação é focalizado no prisma através de uma lente que, por sua vez, também é responsável por controlar o ângulo de incidência para que ocorra a reflexão interna total na interface prisma/amostra. Nesta montagem é utilizada uma objetiva de imersão a água para a captura de imagens da amostra. Imagem retirada de [9].

- O uso de objetivas de imersão à água contribui para a aquisição de imagens de alta qualidade;

3.1.2 TIRF via prisma em um microscópio invertido: prisma sobre a amostra

Os principais esquemas de montagem deste sistema estão apresentados na figura 8. Neste esquema é necessário um porta-amostras que pode ser obtido tanto por vias comerciais quanto preparado com os seguintes componentes:

- Uma lamínula de vidro que posteriormente será posta em contato óptico com a objetiva do microscópio;
- Um espaçador medindo cerca de $60\ \mu\text{m}$. A escolha deste valor está relacionada com um espaçamento que permite a visualização da fluorescência de acordo com a

distância de trabalho das objetivas utilizadas sem que a amostra seja comprimida;

- Uma lamínula de vidro contendo a amostra a ser analisada e que será posta em contato óptico com o prisma através de um óleo de imersão. É importante ressaltar que a amostra deve ser posicionada de forma invertida, de "cabeça para baixo", de modo a permitir a excitação da fluorescência.
- Uma solução tampão que será adicionada entre as duas lamínulas.

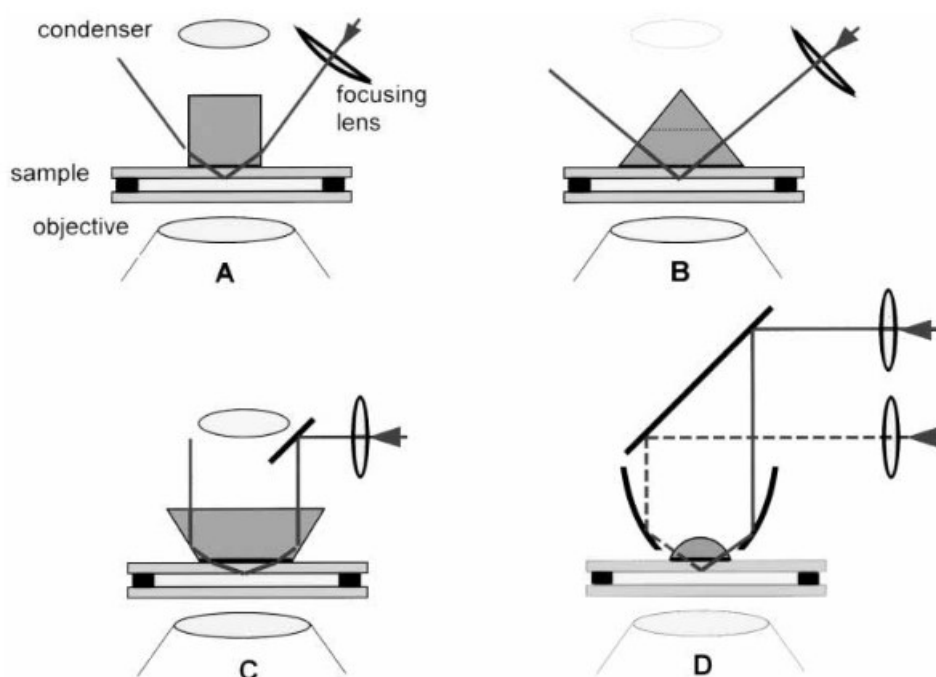


Figura 8 – Montagem esquemática da microscopia TIRF em um microscópio invertido com o prisma posicionado sobre a amostra. Em todas as configurações são preparadas soluções tampão em um porta-amostras, o qual é posto em contato óptico com o prisma via óleo de imersão, sendo, portanto, na interface lamínula superior/amostra onde ocorre a reflexão interna total do feixe incidente. Este porta-amostra é formado por duas lamínulas separadas por um espaçador e a região entre elas é preenchida por uma solução tampão. Nas configurações (A) e (B) o feixe de excitação é focalizado em um prisma retangular e triangular, respectivamente, por uma lente convergente, que também possibilita a variação do ângulo de incidência deste feixe. Nas configurações (C) e (D), além das lentes convergentes, um espelho também é utilizado para focalizar o feixe nos prismas trapezoidal e hemisférico, respectivamente. Imagem retirada de [9].

As configurações A-D apresentam diferentes formatos de prismas feitos de vidro ($n = 1,52$), possibilitando uma variedade de montagens. Em todas estas montagens, o prisma foi posto em contato óptico com a lamínula superior do porta-amostras via óleo de imersão. Para fins de simplificação, a interface formada por prisma + óleo de imersão + lamínula superior do porta-amostras será abreviada somente por prisma, uma vez que o índice de refração desses meios são aproximadamente iguais. Cada uma das configurações possuem vantagens e desvantagens que devem ser consideradas segundo os objetivos dos experimentos.

- Configuração A

Um prisma retangular é posto em contato óptico com a lamínula superior do porta-amostras via óleo de imersão. Neste prisma é incidido um feixe de laser, que por sua vez, é focalizado na interface prisma/amostra através de uma lente convergente. O ângulo de incidência é ajustado ou através da lente focalizadora ou variando a posição da fonte de luz.

Dito isto, a principal vantagem desta configuração está no formato do prisma. Por ter o formato retangular, a luz transmitida provinda do condensador não sofre desvios relevantes ao passar pelo prisma, permitindo assim, combinar a técnica de TIRF com outras técnicas, como as microscopias de contraste de fase e de campo escuro.

- Configuração B

Nesta configuração, um prisma triangular é utilizado, podendo tanto ser um prisma equilátero, 60° - 60° - 60° , quanto um prisma reto, 45° - 45° - 90° . Novamente, o feixe incidente é focalizado na interface prisma/amostra através de uma lente por meio da qual é possível controlar o ângulo de incidência. Porém, o ângulo máximo de incidência é limitado pelos formatos do prisma: para o prisma equilátero este ângulo máximo é de aproximadamente 79° enquanto para o prisma reto é de cerca de 73° (ver Apêndice).

Diferentemente da montagem A, esta montagem não permite a combinação do TIRF com as técnicas de microscopia de contraste de fase e campo escuro devido ao formato pontiagudo da superfície do prisma voltada para o condensador.

- Configuração C

Nesta configuração, um prisma trapezoidal de 60° é utilizado. O feixe incide na vertical de forma que o ângulo de incidência é fixo em 60° . Entretanto, este ângulo não gera reflexão interna na interface prisma/amostra ao ser focalizado pela lente. Uma maneira de contornar este problema é substituir o material do qual o prisma é feito. Uma opção é um prisma trapezoidal feito de vidro tipo silicato ($n = 1,66$). Com este novo material, o ângulo máximo de incidência passa a ser de 69° .

- Configuração D

Nesta configuração, o feixe incide em um espelho parabólico e é direcionado para um prisma esférico de forma a ser focalizado no foco da parábola, que está posicionado no plano da interface formada pelo prisma e a amostra.

A principal vantagem desta montagem é a maior liberdade de escolha dos ângulos de incidência e a possibilidade de gerar franjas de interferência ao incidir dois feixes que irão refletir nos espelhos em posições azimutais diferentes de forma a gerar interferências construtivas e destrutivas ao se combinarem no foco da parábola localizado no plano da interface. Por outro lado, a desvantagem desta montagem está

na dificuldade de alinhamento do sistema para permitir o posicionamento correto dos espelhos e do prisma.

3.1.3 TIRF via prisma em um microscópio invertido: prisma sob a amostra

Em alguns casos, posicionar o prisma acima da amostra pode apresentar problemas de acessibilidade à ela. Para contornar este problema, há a possibilidade de montar um sistema onde o prisma se localiza abaixo da amostra, como mostrado na figura 9.

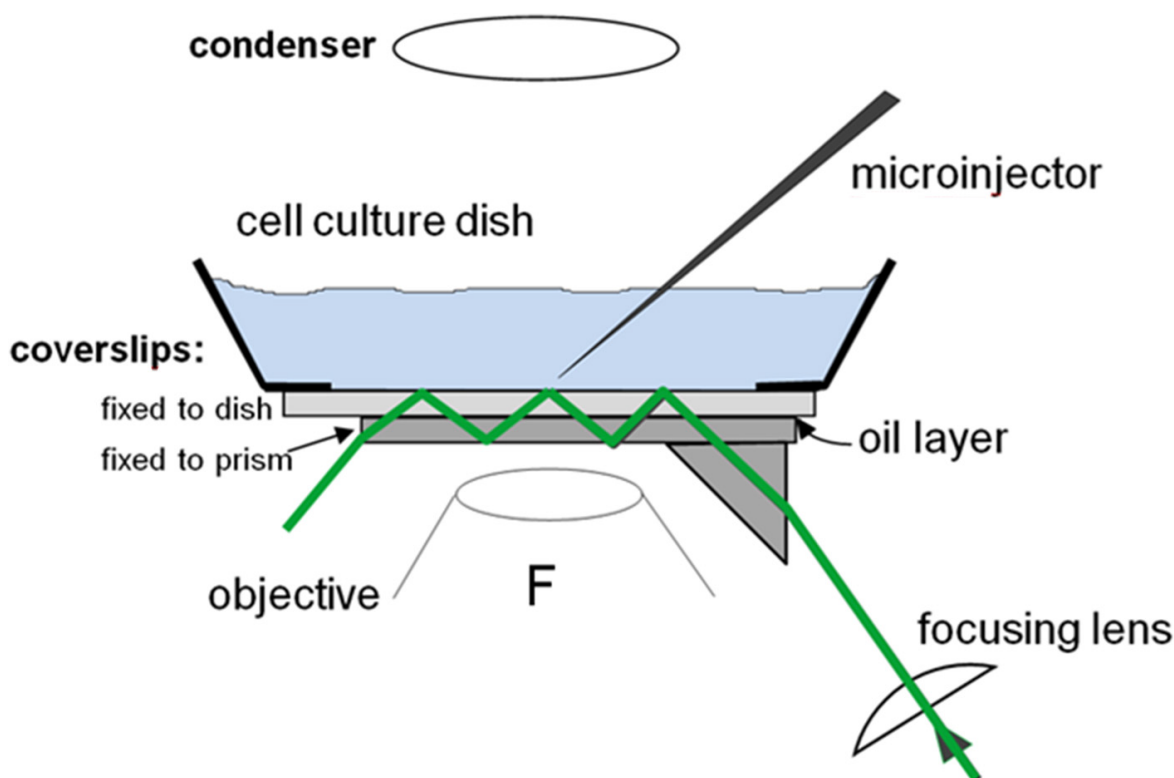


Figura 9 – Montagem esquemática do TIRF em um microscópio invertido com o prisma posicionado sob a amostra. Nesta configuração, o prisma é fixado em uma lamínula de intercessão que, por sua vez, é colocada em contato óptico com uma segunda lamínula de forma a funcionar como uma guia de onda onde múltiplas reflexões internas totais ocorrem na interface lamínula/amostra ao se ter um feixe de laser focalizado no prisma na angulação correta. Imagem retirada de [12].

Esta configuração se assemelha a uma guia de onda, dado que um prisma triangular é fixado em uma lamínula de vidro, chamada aqui de lamínula de intercessão. Esta lamínula é colocada em contato óptico com a parte inferior da lamínula da amostra via óleo de imersão. Um feixe de excitação é direcionado ao prisma em uma angulação que permite que diversas reflexões internas totais ocorram dentro do sistema de lamínulas, gerando assim um campo evanescente capaz de penetrar na amostra.

As desvantagens desta montagem se concentram na dificuldade de posicionamento do prisma, uma vez que ele é posto próximo à objetiva do microscópio e, portanto, sua geometria é limitada. Além disso, o uso de objetivas de imersão à óleo são impossibilitadas,

posto que estas iriam frustrar as diversas reflexões internas ocorridas no sistema de lamínulas.

3.2 TIRF via objetiva

Nesta configuração da microscopia TIRF, uma objetiva de grande abertura numérica, $NA > 1,40$, é acoplada a um microscópio invertido e utilizada para direcionar o feixe de excitação em um ângulo $\theta > \theta_c$ de forma a ter a geração de um campo evanescente na interface lamínula/amostra por meio do fenômeno de reflexão interna total do feixe incidente. Posto que o feixe precisa incidir em um ângulo $\theta > \theta_c$, é imprescindível que este seja focalizado no *back focal plane* (BFP) da objetiva de forma a emergir colimado e garantir que todos os raios do feixe incidam na interface lamínula/amostra em uma mesma angulação e, portanto, que todos estejam no regime de reflexão interna total. O controle angular deste feixe, por sua vez, é feito através de uma lente externa ao microscópio e acoplada a um deslocador que tem por objetivo focalizar o feixe no BFP da objetiva, porém em um ponto deslocado do eixo óptico, permitindo que o feixe incida sobre a amostra em um ângulo θ em relação à este eixo, como mostra a figura 10.

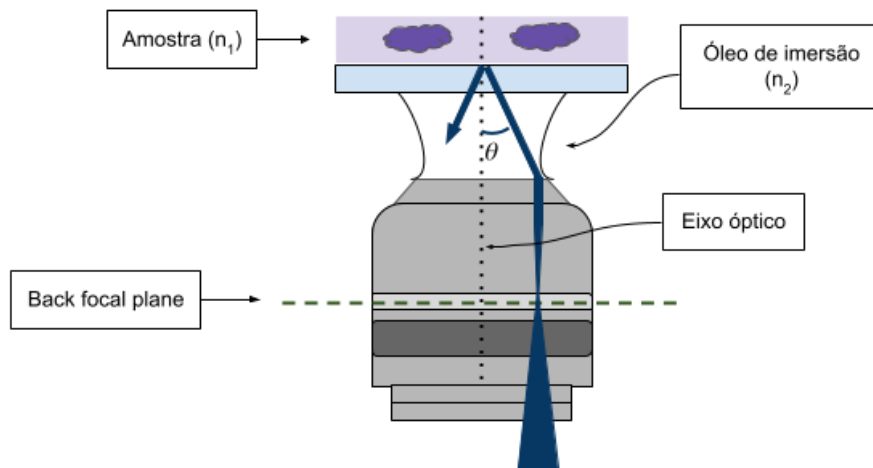


Figura 10 – Esquema de iluminação do *BFP* da objetiva no regime de reflexão interna total.

Isto posto, as principais características desta configuração são:

- O uso de objetivas de alta abertura numérica;
- O campo evanescente não é tão puro quanto o campo gerado nas montagens de TIRF via prisma devido ao espalhamento da luz ao incidir sobre os componentes ópticos do sistema, como a objetiva;

- A amostra é totalmente acessível durante o uso da técnica;
- A própria óptica do microscópio é utilizada para o *setup* da montagem;
- O campo de iluminação possui uma área menor quando comparado com as montagens utilizando o prisma devido ao caminho óptico que o feixe realiza dentro da objetiva, uma vez que a luz sai pela região periférica deste componente óptico a fim de permitir a angulação desejada;
- Fácil combinação com outras técnicas de microscopia;
- O ângulo máximo de incidência depende da abertura numérica da objetiva;
- Há a possibilidade de usar diversos comprimentos de onda de excitação em uma mesma montagem.

A figura 11 apresenta diferentes montagens utilizando as possíveis portas do microscópio e diferentes fontes de luz. Todas as configurações, entretanto, requerem o uso de um microscópio invertido, um espelho dicróico posicionado dentro do cubo de fluorescência do microscópio e de pelo menos uma lente para focalizar o feixe no BFP da objetiva.

- Configuração A

Nesta montagem, um feixe de laser incide na porta lateral do microscópio, após passar por um expensor de feixes, e, em seguida, é focalizado no BFP da objetiva por uma lente L a fim de que incida de forma colimada na interface lamínula/amostra. O controle do ângulo de incidência é feito através da lente L , o que permite variar entre o regime de epifluorescência e TIRF.

- Configuração B

Nesta configuração, uma fibra óptica é utilizada como fonte de excitação e o feixe incide pela porta traseira do microscópio. O feixe de excitação é direcionado para a amostra através de um conjunto composto por um espelho (ou prisma) e um espelho dicróico, antes de ser focalizado no BFP da objetiva por uma lente externa ao microscópio. A porta traseira utilizada corresponde à porta normalmente destinada à instalação da lâmpada de mercúrio para a realização da microscopia de epifluorescência do microscópio.

- Configuração C

Nesta configuração, um expensor de feixes atua no laser que, por sua vez, incide na porta traseira do microscópio após passar pelo par de lentes $L1$ e $L2$, que além de formar um plano conjugado com o BFP da objetiva, são responsáveis pelo ajuste da posição angular do feixe incidente. O feixe é, então, direcionado para a amostra

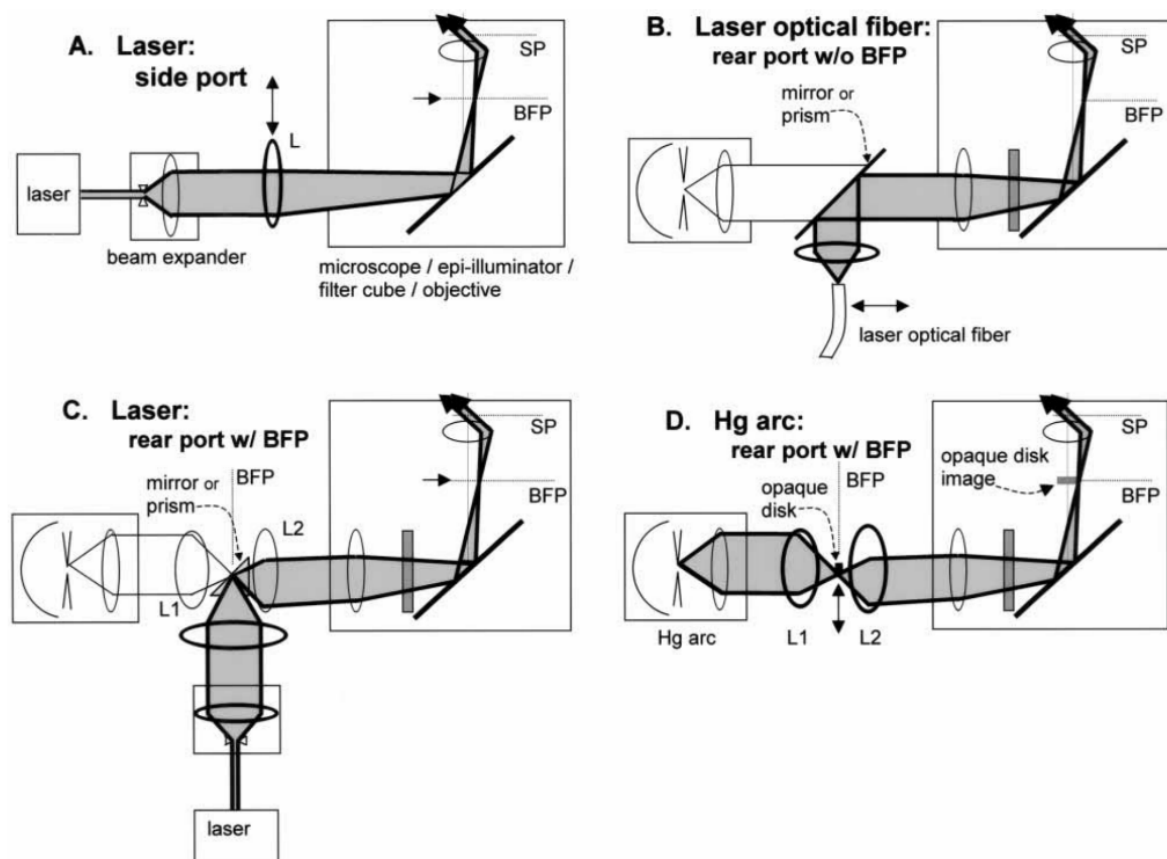


Figura 11 – Montagem esquemática do TIRF via objetiva. Nas configurações, as siglas possuem o seguinte significado: SP se refere ao plano da amostra (*sample plan*); OBJ indica a objetiva e BFP indica o seu *back focal plane* ou seu plano conjugado equivalente. Os componentes ópticos desenhados com linhas em negrito indicam componentes que devem ser instalados durante a montagem enquanto aqueles desenhados com linhas mais finas indicam os componentes que podem ou não estar previamente instalados no microscópio. Na configuração (A) um feixe de laser incide pela porta lateral do microscópio e é focalizado no BFP da objetiva por meio de uma lente L. A configuração (B) utiliza uma fibra óptica como fonte de luz que, por sua vez, incide pela porta traseira do microscópio e é focalizada no BFP da objetiva por meio de uma lente. Na configuração (C) o laser incide na porta traseira do microscópio e é focalizado no BFP da objetiva por um conjunto de lentes L1 e L2. Por fim, a configuração (D) utiliza uma lâmpada de mercúrio como fonte de luz. Um disco opaco posicionado em um plano equivalente ao BFP da objetiva é utilizado com o intuito de que se tenha a angulação correta para que o feixe sofra reflexão interna total na interface lamínula/amostra. Imagem retirada de [9].

através de um conjunto composto por um espelho (ou prisma) e um espelho dicróico para que se tenha a reflexão interna total na interface lamínula/amostra.

- Configuração D

Nesta configuração, uma lâmpada de mercúrio é utilizada como fonte de excitação. Um disco opaco é posto no plano conjugado ao BFP da objetiva de forma a selecionar uma região angular formada por ângulos $\theta > \theta_C$. A ideia é realizar o imageamento desta região no BFP devido à equivalência dos planos formados pelas lentes L1 e L2.

Tendo em vista o que foi apresentado, as escolhas referentes às configurações se baseiam nos objetivos das pesquisas envolvendo a microscopia TIRF, no custo benefício e

nos materiais disponíveis para as montagens. A análise das vantagens e desvantagens são de fundamental importância para a escolha da montagem mais adequada a cada tipo de experimento e objetivo de pesquisa. Dito isso, o presente trabalho utiliza a configuração TIRF via objetiva devido: (1) à facilidade do acesso à amostra; (2) à praticidade em aproveitar a óptica do microscópio invertido para a montagem experimental; (3) à maior liberdade de escolha de ângulos de incidência; (4) à facilidade de combinar a técnica de TIRF com outras técnicas de microscopia, como a epifluorescência e a microscopia de desfocalização e (5) à maior facilidade de se obter medidas da distância de profundidade do campo evanescente gerado na interface onde ocorre a reflexão interna total do feixe incidente.

Com a escolha do TIRF via objetiva, dois parâmetros físicos tornam-se essenciais para o bom funcionamento da técnica: a abertura numérica e o *back focal plane* da objetiva. Nas subseções seguintes, esses parâmetros serão detalhados e seus conceitos físicos discutidos.

3.2.1 Abertura numérica

A abertura numérica (NA) é definida como uma grandeza adimensional de um sistema óptico responsável por mensurar a capacidade deste sistema de coletar luz e, por conseguinte, o seu poder de resolução. Em microscopia, essa grandeza é definida como:

$$NA = n \sin(\theta_M) \quad (3.1)$$

Em que n é o índice de refração do meio entre a objetiva e a amostra, normalmente sendo ar, água ou o óleo de imersão, e θ_M é o ângulo que indica a abertura angular máxima da objetiva, como mostrado na figura 12.

Como visto na seção anterior e na relação 3.1, ao realizar uma montagem de um TIRF via objetiva é necessário considerar a abertura numérica da objetiva utilizada, uma vez que esta irá definir o ângulo máximo de incidência e a resolução da imagem, que é dada por:

$$\text{Resolução lateral : } R_{XY} = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{\lambda}{2n \sin(\theta)} \quad (3.2)$$

$$\text{Resolução axial : } R_Z = \frac{2\lambda}{(NA)^2} = \frac{2\lambda}{(n \sin(\theta))^2}$$

Para um feixe $\lambda = 488nm$ incidindo em uma objetiva de imersão à óleo e de $NA = 1,49$, como utilizado nos experimentos, as resoluções especiais são da ordem de $R_{XY} \approx 164nm$ e $R_Z \approx 440nm$.

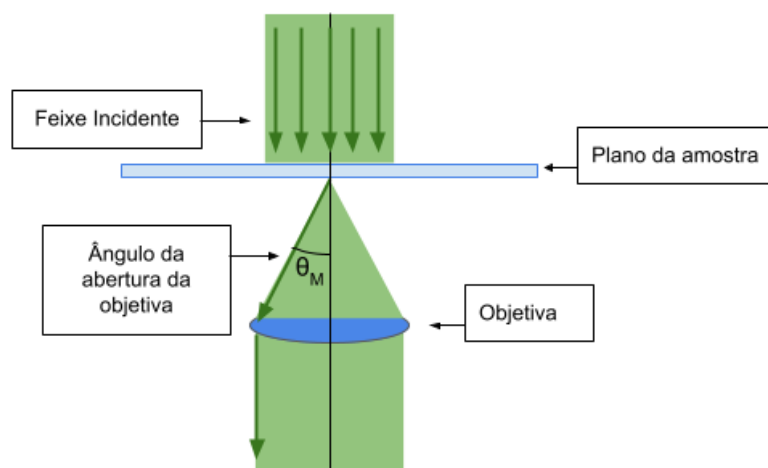


Figura 12 – Esquema identificando a abertura angular máxima referente a uma objetiva. Um feixe incide sobre a amostra, que reflete e espalha os raios que por sua vez são coletados pela objetiva. O ângulo máximo desta coleta é dado em função da abertura numérica.

Há atualmente diversas objetivas de microscópio montadas especialmente para a microscopia TIRF cuja abertura numérica pode variar de 1,40 a 1,70 e com magnificações indo de 60 a 100X. Essa alta NA é possível devido ao uso dos meios de imersão, como o óleo, cujo índice de refração é compatível com o do vidro utilizado nas lamínulas de forma a reduzir a quantidade de raios refratados no caminho entre a amostra e a objetiva, e assim aumentar o poder de resolução do sistema óptico.

3.2.2 O *back focal plane* da objetiva

A qualidade das montagens da microscopia TIRF se baseia na capacidade de uma boa focalização do feixe incidente no BFP da objetiva. Isso ocorre porque esta focalização do feixe incidente está intimamente relacionada com o tamanho da região focal gerada pelas lentes que formam a objetiva que, por sua vez, está relacionado à diminuição do espalhamento dentro deste componente óptico e que, por sua vez, está relacionado ao quão colimado o feixe irá emergir em direção à amostra.

O *back focal plane*, ou o plano de Fourier, da objetiva é um plano focal localizado, no presente caso, dentro deste sistema óptico. É neste plano onde ocorre a transformada de Fourier da amostra, localizada no plano focal da objetiva como mostra a figura 13. Em outras palavras, é no BFP onde se tem a formação do padrão de difração gerado pelos feixes de luz espalhados pela amostra e, posteriormente, coletados pela objetiva [14]. Após incidirem na lente da objetiva, esses raios são colimados e direcionados para a lente de tubo do microscópio, onde são focalizados para a formação da imagem da amostra.

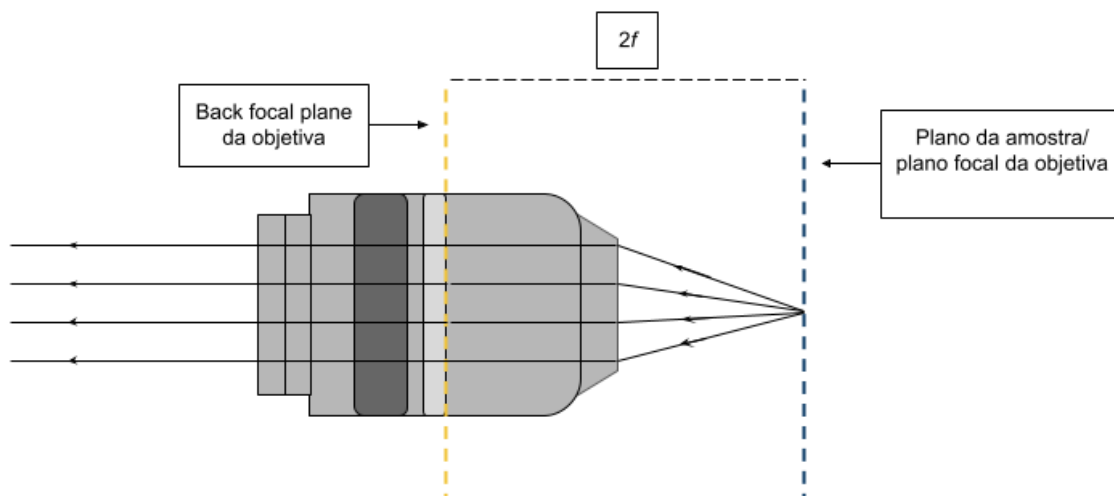


Figura 13 – Esquema do trajeto dos raios emergentes de uma amostra, localizada no plano focal da objetiva, que são colimados após serem focalizados no BFP da objetiva.

Como visto, nos experimentos envolvendo a microscopia TIRF, o trajeto do feixe incidente é contrário ao demonstrado na figura 13, mas a física do fenômeno é a mesma. Uma lente convergente é responsável por focalizar o feixe de excitação no BFP da objetiva. Este feixe, por sua vez, emerge em direção à amostra de forma colimada a fim de que cada raio esteja em uma mesma angulação e todos estejam no regime de reflexão interna total, como esquematizado na figura 14.

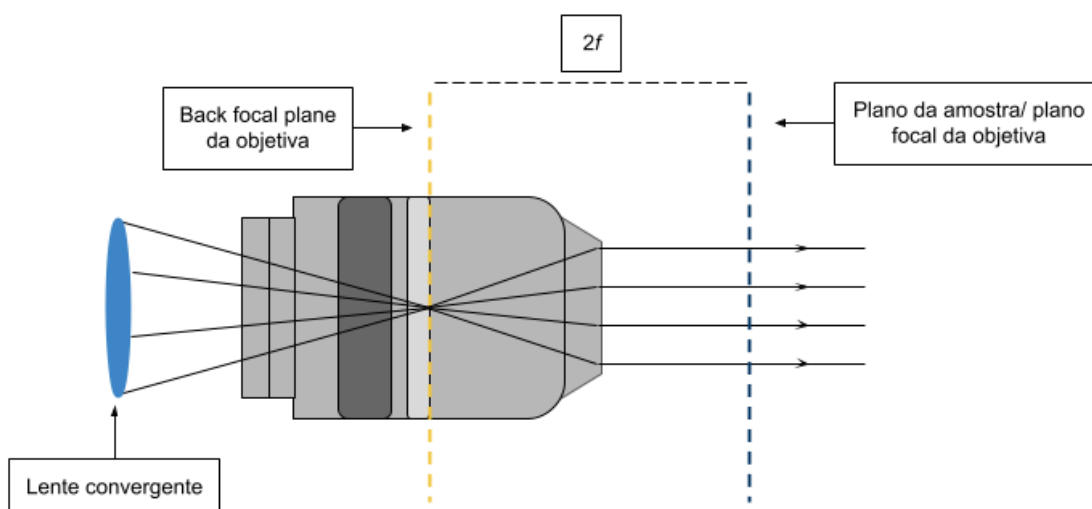


Figura 14 – Esquematização do trajeto dos raios focalizados no BFP da objetiva por uma lente externa a fim de ter a geração de um feixe colimado incidindo sobre a amostra.

4 MONTAGEM EXPERIMENTAL: TIRF VIA OBJETIVA

Neste capítulo serão abordados os detalhes da montagem óptica responsável pelo acesso à técnica de microscopia TIRF, a razão da escolha do caminho óptico utilizado e o método de checagem de focalização do feixe no BFP da objetiva.

Em seguida, será apresentado a montagem óptica que possibilitou a caracterização do campo evanescente gerado pela técnica de microscopia de reflexão interna total. Esta caracterização tem por finalidade comprovar a existência de um campo evanescente assim como o seu comportamento exponencial previsto pela teoria, além de garantir uma estimativa mais precisa da distância de penetração deste campo nas posteriores amostras a serem analisadas.

4.1 Montagem experimental de um TIRF via objetiva

Para a montagem óptica de um TIRF via objetiva foi utilizado um microscópio invertido (Eclipse TE300, Nikon), uma objetiva Nikon (Apo TIRF, 100X de magnificação, imersão à óleo, 1,49 de abertura numérica) e um laser diodo de comprimento de onda $\lambda = 488nm$ (MDL-III-488L-50mW, CNI Laser). O índice de refração do óleo de imersão utilizado foi medido através de um refratômetro e obteve-se um valor de $n_O = 1,5085 \pm 0,0005$. A montagem está esquematizada na figura 15. O seguinte protocolo foi seguido para a montagem e sua respectiva verificação:

1. Inicialmente, o laser foi incidido em um expensor de feixes, que também atua como um filtro espacial. Este filtro (*Spatial Filter System*, KT311, ThorLabs, Inc.), por sua vez, é composto por um *pinhole* de $20\mu m$ ($\emptyset 1$ Mounted Pinhole, $20 \pm 2\mu m$ Pinhole Diameter, Stainless Steel, P20K, ThorLabs, Inc.) que foi posto entre duas lentes plano-convexas de focos de $25mm$ (N-BK7 Plano-Convex Lens, $\emptyset 1"$, $f = 25mm$, LA1951, Thor Labs, Inc.) e $200mm$ (N-BK7 Plano-Convex Lens, $\emptyset 1"$, $f = 200mm$, LA1708, Thor Labs, Inc.), respectivamente. A função deste filtro espacial, além de expandir o diâmetro do feixe incidente, é gerar um perfil de intensidade descrito por uma função gaussiana pura, uma vez que o feixe incidente possui variações na sua intensidade que geram ruídos em seu perfil. A esquematização deste filtro está representado na figura 16.

Um dos sinais visíveis destes ruídos é observado através do formato elíptico do feixe. Este formato se deve à diferença entre os ângulos de divergência normal e ortogonal

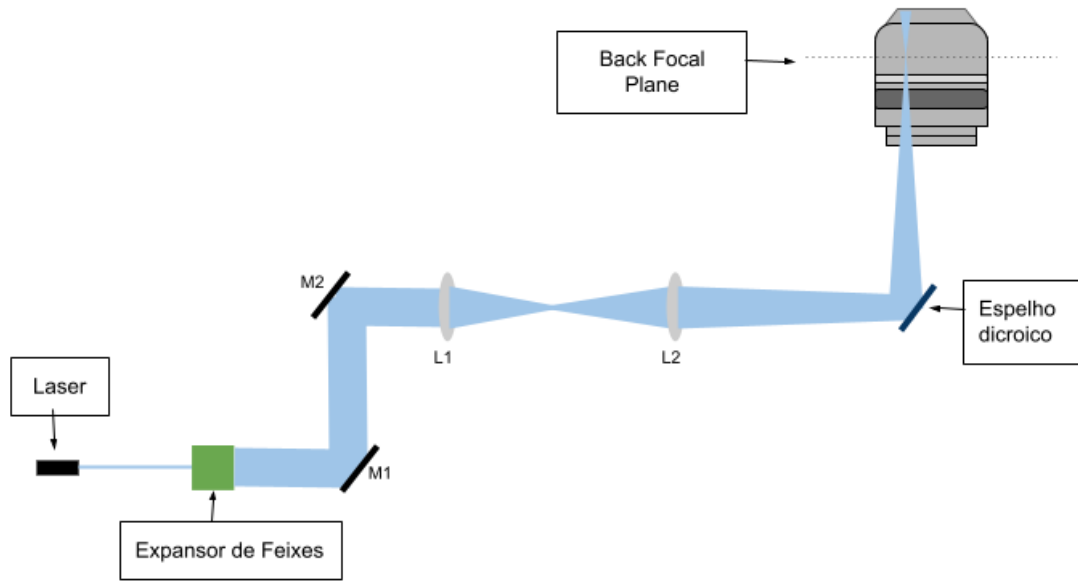


Figura 15 – Esquema de montagem experimental do TIRF via objetiva onde um feixe de laser 488 nm, após passar por um expansor de feixe, é direcionado ao conjunto de lentes L1 e L2 por meio dos espelhos M1 e M2, sendo o espelho M2 a representação de periscópio formado por dois outros espelhos, e, em seguida, é direcionado à objetiva por meio de um espelho dicróico. O plano focal do conjunto de lentes L1 e L2 corresponde ao plano conjugado com o *back focal plane* possibilitando, assim, a focalização do feixe no *BFP* de forma que os raios incidentes saiam aproximadamente colimados da objetiva.

do feixe em relação ao plano de secção retangular da abertura de emissão do laser diodo. Tal diferença faz com que uma componente do feixe convirja mais rapidamente do que a outra, resultando em um *spot* elíptico, como mostrado na figura 17.

Dito isso, o feixe elíptico foi focalizado no centro do *pinhole* por uma lente convergente de forma a ser transformado em um feixe gaussiano descrito por um pico central e por franjas laterais de interferência. Estas franjas representam os ruídos espaciais devido à variação da intensidade do feixe, cujas posições radiais são proporcionais às suas frequências espaciais. Dessa forma, ao focalizar o feixe de modo a localizar seu pico central no centro do *pinhole*, as franjas laterais foram bloqueadas e obteve-se um feixe com um perfil de intensidade "puro", como mostrado na figura 18.

Por fim, o raio desejado do feixe expandido é controlado através do foco das lentes utilizadas no filtro espacial, como indicado na figura 19. Ao fixar o valor do raio do feixe expandido, é possível estabelecer o valor do foco da lente colimadora. Pela figura 19, tem-se:

$$\begin{aligned} \tan(\theta) &= r_I/f_{LCV} = r_F/f_{LCM} \\ r_F/r_i &= f_{LCM}/f_{LCV} = m \end{aligned} \quad (4.1)$$

Em que m é a magnificação sofrida pelo feixe incidente. Na montagem experimental, tem-se que $r_I = 1,3 \pm 0,5 \text{ mm}$, $f_{LCV} = 25,3 \pm 0,3 \text{ mm}$. Deseja-se que um valor de

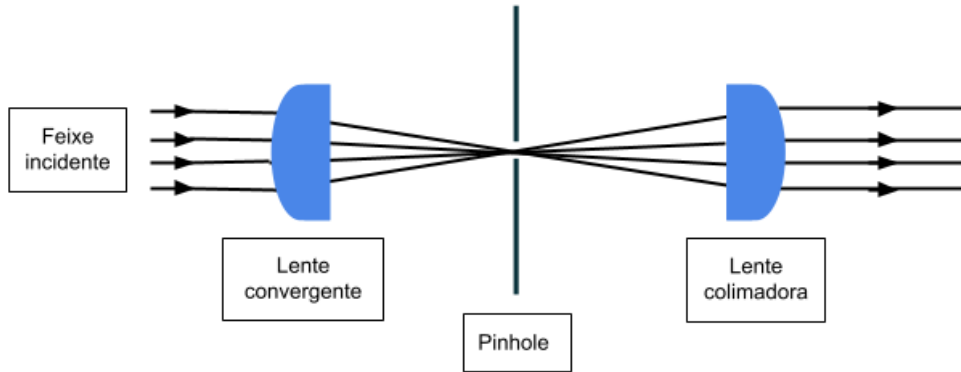


Figura 16 – Representação do filtro espacial utilizado na montagem experimental do TIRF. O feixe de laser incide em uma lente convergente que, por sua vez, o focaliza na abertura do *pinhole*. O feixe, em seguida, passa por uma segunda lente de modo a torná-lo colimado e a ter o seu diâmetro expandido. A magnificação do feixe é dada pela razão entre os focos das lentes colimadora e convergente, respectivamente.

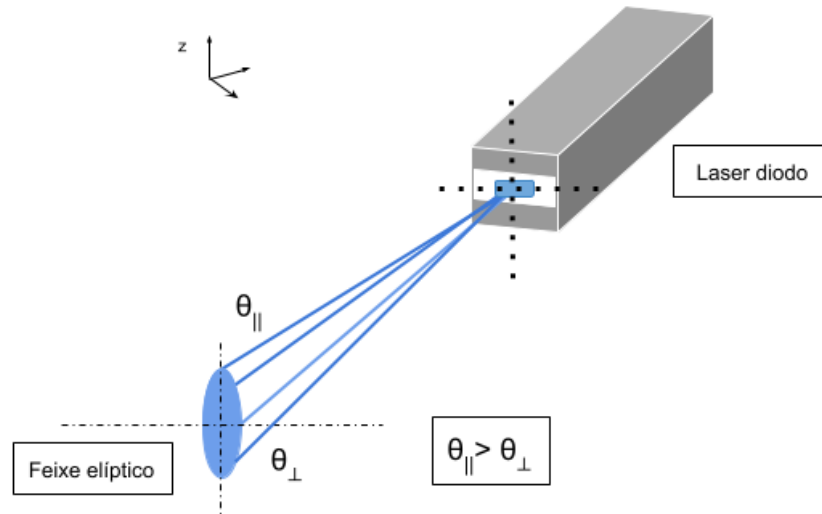


Figura 17 – Representação da diferença dos ângulos de convergência de um feixe elíptico em relação ao plano da área de seção retangular de um laser diodo.

cerca de $r_F = 10,0mm$ a fim de que o diâmetro do feixe esteja em um tamanho satisfatório com relação ao diâmetro de 1" referente aos componentes ópticos utilizados na montagem. Utilizando a relação expressa em 4.1, tem-se que o foco da lente colimadora deve ser cerca de $200nm$. Como dito, a lente colimadora utilizada possui uma distância focal de $199 \pm 2mm$ e, portanto, o raio do feixe expandido é de $10 \pm 4mm$ e a magnificação sofrida é de $m = 7,9 \pm 0,1$.

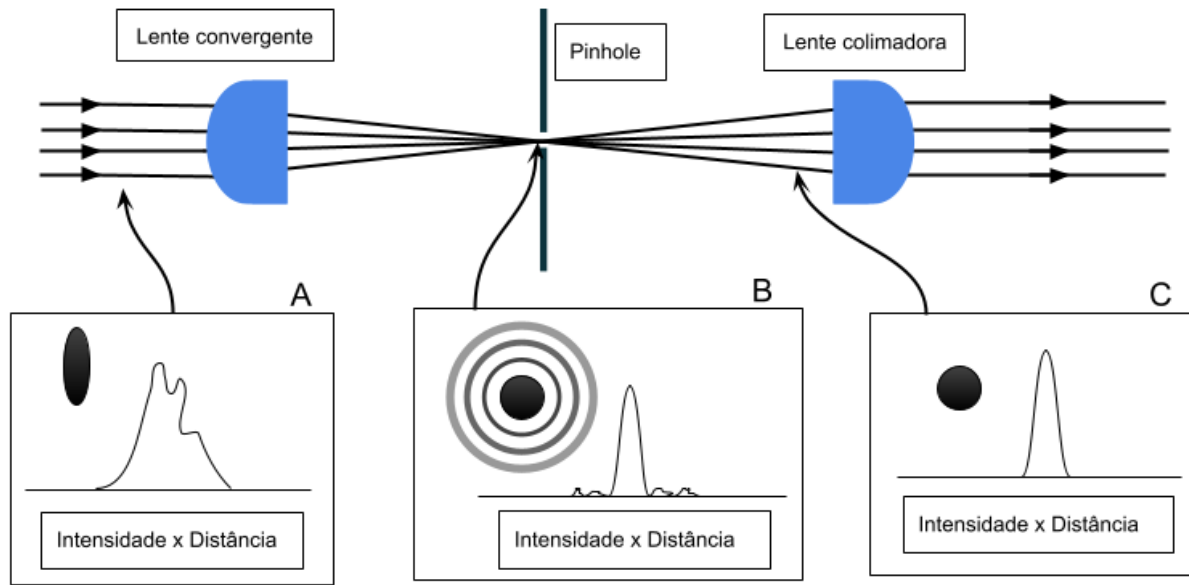


Figura 18 – Representação do perfil de intensidade do feixe em cada etapa do filtro espacial. (A) O feixe incidente possui um formato elíptico e um perfil de intensidade gaussiano não ideal. Após ser focalizado no centro do *pinhole* pela lente convergente, (B) o perfil de intensidade é modificado, passando a ter um pico central gaussiano ideal, porém com ruídos espaciais representados pelas franjas laterais. (C) Ao incidir sobre a lente colimadora, o perfil de intensidade do feixe é descrito por uma função gaussiana pura e o seu *spot* assume um formato esférico.

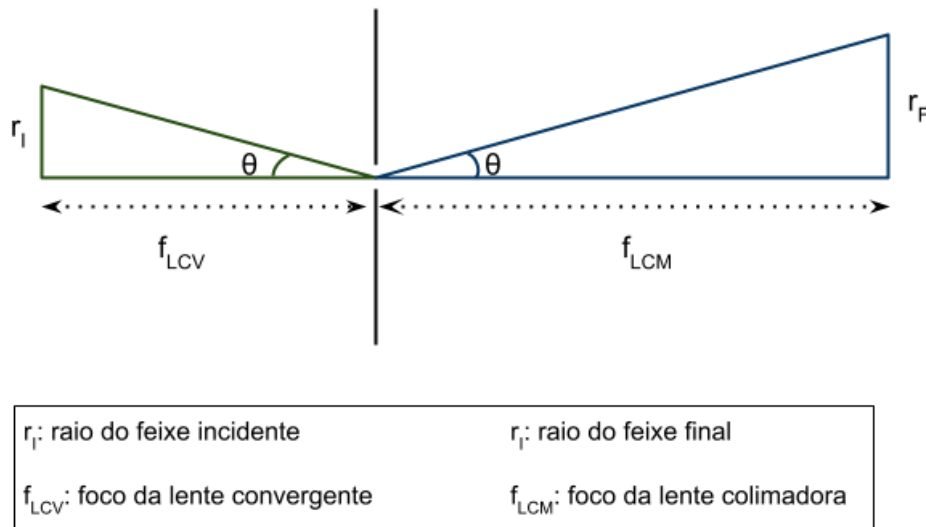


Figura 19 – Representação geométrica da relação entre os raios do feixe incidente e do feixe final, r_I e r_F , respectivamente, e a distância focal das lentes convergente e colimadora, f_{LCV} e f_{LCM} , sob um certo ângulo θ .

- Em seguida, o feixe colimado foi direcionado para a objetiva do microscópio através dos espelhos M1 ($\varnothing 1''$ Protected Silver Mirror, PF10-03-P01, ThorLabs, Inc.), M2 e do espelho dicróico (GFP Dichroic Filter, MD498, ThorLabs, Inc.). O dicróico se encontra dentro de um suporte para cubos de fluorescência do microscópio e o espelho M2 é, na verdade, um conjunto de dois espelhos ($\varnothing 1'' 90^\circ$ Off-Axis Parabolic

Mirror, Protected Silver, MPD119-P01, *ThorLabs, Inc.*) formando um periscópio utilizado para alinhar o feixe com a altura da porta traseira do microscópio. Nesta etapa, o feixe foi mantido completamente alinhado com o eixo óptico, sendo possível observá-lo sair da objetiva e incidir no teto diretamente acima do microscópio.

3. Para focalizar corretamente o feixe no BFP da objetiva, foi utilizado um conjunto de lentes L1 (N-BK7 *Plano Convex Lens*, Ø1", $f=300$ mm, LA1484, *ThorLabs, Inc.*) e L2 (N-BK7 *Plano Convex Lens*, Ø1", $f=100$ mm, LA1509, *ThorLabs, Inc.*), sendo L2 montada sobre um deslocador a fim de que se possa controlar tanto a variação angular do feixe em relação ao eixo óptico, e assim incidi-lo na angulação necessária para entrar no regime de reflexão interna total, quanto a sua posição longitudinal, permitindo focalizar corretamente o feixe no BFP. As lentes L1 e L2 de focos 300mm e 100mm, respectivamente, formam um sistema óptico conjugado com o *back focal plane* da objetiva. Como o BFP se encontra dentro da objetiva, em meio aos seus componentes ópticos, focalizar o feixe diretamente neste plano utilizando uma única lente não é uma tarefa trivial, pois, devido à configuração do próprio microscópio, seria necessário o uso de uma lente de distância focal $f > 150mm$. O problema aqui se estabelece no fato de que a região focal de uma lente, apesar de ser representado por um ponto, é, na prática, uma pequena região contida no BFP de modo que lentes com distâncias focais maiores geram maiores regiões de foco, uma vez que os feixes focalizados apresentam um maior raio de secção transversal (um maior comprimento da cintura do feixe) o que, por sua vez, afeta a colimação do feixe. Devido à isso, foi montado um sistema de forma que o feixe incidente é facilmente focalizado em um plano conjugado ao BFP, porém externo ao microscópio, utilizando uma lente de distância focal menor.
4. Ao inserir as lentes L1 e L2 na montagem óptica, o *spot* do laser observado no teto irá aparentar um tamanho menor com relação ao tamanho observado no item 2. Nesta etapa, a lente L2 posicionada sobre o deslocador, foi movida longitudinalmente de forma a minimizar o *spot* do feixe observado. A posição de L2 que permite a minimização do feixe é a posição em que o sistema L1-L2 o focaliza no BFP, fazendo-o emergir da objetiva aproximadamente colimado.
5. Para verificar a qualidade da montagem foi realizado um teste padrão utilizando microesferas de poliestireno de $1\mu m$ revestidas de fluoresceína. Foi montada uma amostra contendo $10\mu l$ de esferas fluorescentes para $1ml$ de água destilada. Em seguida, $10\mu l$ desta solução foi posto em uma lamínula de vidro (*Cover glass*, 24x60, *Corning, ThermoFisher Inc.*) que, por sua vez, estava em contato óptico com a objetiva via óleo de imersão. Aguardou-se cerca de 30 minutos para que todas as esferas aderissem à lamínula. Em seguida, foi posto $10\mu l$ da amostra feita de forma a se ter tanto esferas aderidas quanto em solução. Ao observar as esferas através da

técnica de epifluorescência (feixe de incidência formando um ângulo $\theta = 0$ com o eixo óptico), pôde-se notar a luminescência tanto das esferas aderidas quanto daquelas em solução. Entretanto, ao variar o ângulo de incidência movendo lateralmente a lente L2, de modo que o feixe é posto em reflexão interna total ($\theta > \theta_C$), observou-se um abrupto escurecimento da imagem indicando que o sistema entrou no regime de TIRF e somente a luminescência das esferas aderidas passaram a ser visíveis. Isto foi comprovado ao variar o foco da amostra e não se observar as esferas postas em solução, mas somente aquelas aderidas na interface lamínula/amostra.

4.2 Medição da profundidade do campo evanescente

A medição da profundidade do campo evanescente se deu através da montagem esquematizada na figura 20.

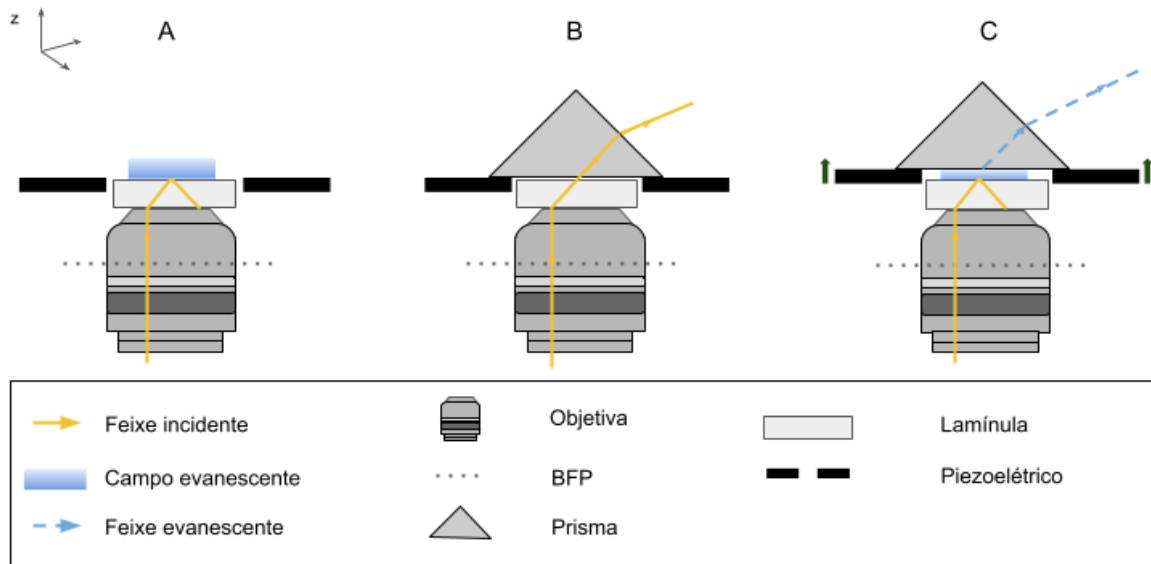


Figura 20 – Montagem experimental utilizada para a medição do campo evanescente. Em (A) o feixe incidente na objetiva sofre reflexão interna total na interface lamínula/ar gerando, assim, um campo evanescente. Em (B) um prisma, de índice de refração coincidente com o da lamínula, é posicionado sobre o piezoelétrico e em contato com a lamínula de forma que a reflexão interna total é frustrada e o feixe incidente se propaga pelo prisma. Em (C) o prisma é movido nanometricamente através do piezoelétrico de forma a criar uma camada de ar entre a lamínula e o prisma. Como o ângulo de incidência não foi variado, o feixe sofre reflexão interna total na interface lamínula/ar gerando, portanto, um campo evanescente que, por sua vez, penetra no prisma e é visualizado em um anteparo.

1. O sistema óptico montado conforme explicitado na seção anterior foi posto no regime de reflexão interna total de forma a ter a geração do campo evanescente na interface lamínula/ar. Porém, diferentemente da montagem anterior, um piezoelétrico (*Digital Piezo Controller*, E-710.3CD, *Physik Instrumente (PI) GmbH and Co. KG*) foi acoplado ao sistema, como mostrado em 20.

2. Em seguida, um prisma reto, 45° - 45° - 90° , de vidro ($n = 1,52 \pm 0,06$ para $\lambda = 488\text{nm}$), foi posto em contato óptico com uma lamínula de microscopia de mesmo material e apoiado sobre o piezoelétrico de forma a possibilitar um controle nanométrico da variação de sua altura em relação a lamínula. Devido à compatibilidade dos índices de refração da lamínula e do prisma, o feixe incidente não sofre refração relevante ao passar de um meio para o outro (20B). Entretanto, irregularidades na superfície do prisma podem espalhar a luz incidente e prejudicar a visualização do campo evanescente. Para amenizar este problema, uma segunda lamínula de vidro foi posta em contato óptico com a superfície maior do prisma via óleo de imersão, $n_o = 1,5085 \pm 0,0005$, que, por sua vez, é compatível com o índice de refração do vidro. O sistema prisma + óleo de imersão + segunda lamínula será abreviado, por conveniência, como prisma nas discussões que se seguem.

3. Definindo a interface lamínula/prisma como o plano $z = 0$, o prisma é movido nanometricamente no sentido positivo do eixo z através do piezoelétrico, de modo que uma camada nanométrica de ar é formada entre a lamínula e o prisma. Como um ângulo $\theta > \theta_C$ foi estabelecido no início da montagem, há a ocorrência do fenômeno de reflexão interna total na interface lamínula/ar e, portanto, a geração de um campo evanescente na região entre a lamínula e o prisma. Parte deste campo evanescente penetra no prisma, uma vez que a distância entre o prisma e a lamínula é de apenas alguns nanômetros, como exemplificado em 20C. Ao emergir do prisma, este campo é capturado por uma câmera tipo CMOS (DCC3240C *High-Sensitivity*, USB 3.0 CMOS Camera, *ThorLabs, Inc.*), através do *software uEye Cockpit (IDS Imaging Development Systems GmbH)*, e a análise da sua intensidade é tratada através do *software ImageJ* [30]. À medida que a distância entre o prisma e a lamínula foi aumentada, a intensidade deste campo decai devido ao seu comportamento evanescente. Através desta montagem, portanto, é possível obter a intensidade média do feixe em função do seu deslocamento em z .

5 CARACTERIZAÇÃO DA MONTAGEM ÓPTICA: TIRF VIA OBJETIVA

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos com a montagem experimental do TIRF protocolado no capítulo anterior e suas respectivas análises. Estes resultados testificam a qualidade da montagem através de um teste padrão, utilizando uma solução de microesferas de $1\mu m$ feitas de poliestireno e revestidas de fluoresceína, e através da medição da profundidade do campo evanescente gerado. O teste padrão permite uma análise qualitativa da montagem e do comportamento exponencial do campo gerado na interface lamínula/amostra enquanto a caracterização da profundidade do campo evanescente permite uma análise quantitativa deste campo gerado assim como os fatores que o influenciam.

5.1 Qualidade do TIRF

Antes de realizar qualquer medição da qualidade do TIRF, os filtros de fluorescência foram escolhidos. Como se trata de uma excitação monocromática ($\lambda = 488nm$), o filtro de excitação foi desprezado. O espelho dicróico utilizado (GFP *Dichroic Filter*, MD498, *ThorLabs, Inc.*) possui uma banda de reflexão definida por $452 - 490nm$ e uma banda de transmissão na faixa de $505 - 800nm$, como explicitado no site do fabricante. A escolha do filtro de emissão, por sua vez está intimamente ligada ao espectro de emissão dos possíveis fluoróforos excitados no comprimento de onda utilizado. O espectro de transmissão do filtro escolhido foi medido através do *software Spectra suite (USB 4000, Ocean Optics)* e possui uma banda de transmitância na faixa de $520 - 563nm$ como representado na figura 21.

Após a escolha do filtro de emissão, o teste da qualidade do TIRF foi aplicado. Este teste consiste em filmar uma mesma região da amostra em vários planos focais sob dois regimes diferentes: epifluorescência e TIRF. No regime de epifluorescência, o plano da amostra foi filmado e definido como o plano $z = 0$. Em seguida, o foco do microscópio foi variado a fim de se ter acesso a outros planos focais, caracterizados por $z > 0$. Após este passo, o plano da amostra foi focalizado novamente e o ângulo de incidência variado até o sistema entrar em regime TIRF. Neste regime, o mesmo procedimento foi realizado e registrado. O resultado do teste está apresentado na figura 22 e a versão em vídeo está disponibilizada em [31].

O teste qualitativo apresentou os resultados esperados: (1) No regime de epiflu-

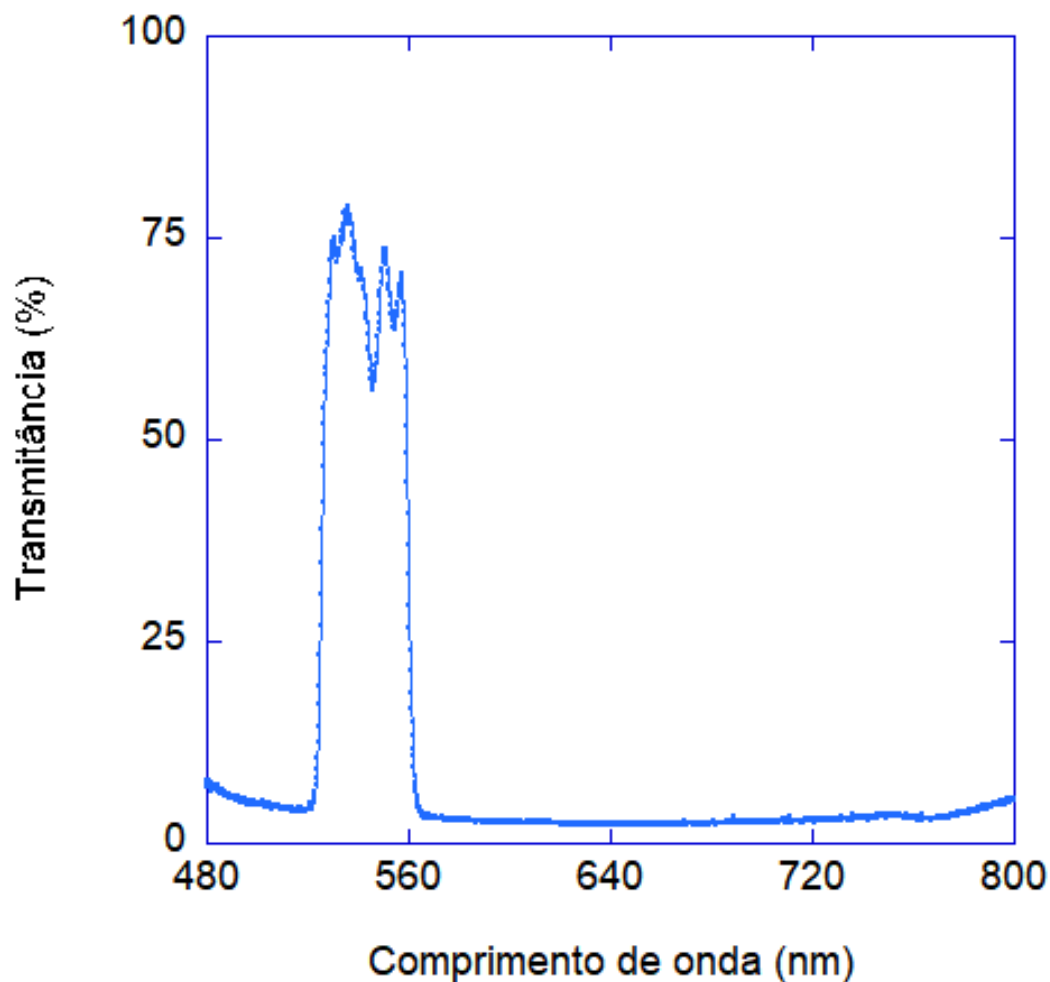


Figura 21 – Espectro de transmissão do filtro de emissão utilizado. A banda de transmissão compreende o intervalo definido por 520 – 563nm.

orescência, no plano da amostra, $z = 0$, foi observado a luminescência tanto das esferas aderidas quanto das esferas em solução, de modo que a intensidade da fluorescência é qualitativamente alta, como mostrado em 22(A). À medida que se desloca o plano focal para planos $z > 0$, ou seja, à medida que se tem acesso ao volume da amostra, é possível observar tanto as esferas em solução quanto a luminescência dos outros planos da amostra como visto em 22(C e E); (2) No regime de TIRF, quando focalizado no plano da amostra, 22(B), há um decréscimo da intensidade quando comparado com 22(A). Isso ocorre porque somente a fluorescência das esferas aderidas é excitada, não sendo possível observar a fluorescência de outros planos da amostra 22(D e F). À medida que se imageia o volume da amostra, nenhuma esfera em solução é visualizada, uma vez que o comportamento evanescente do campo elétrico impõe uma profundidade d de algumas

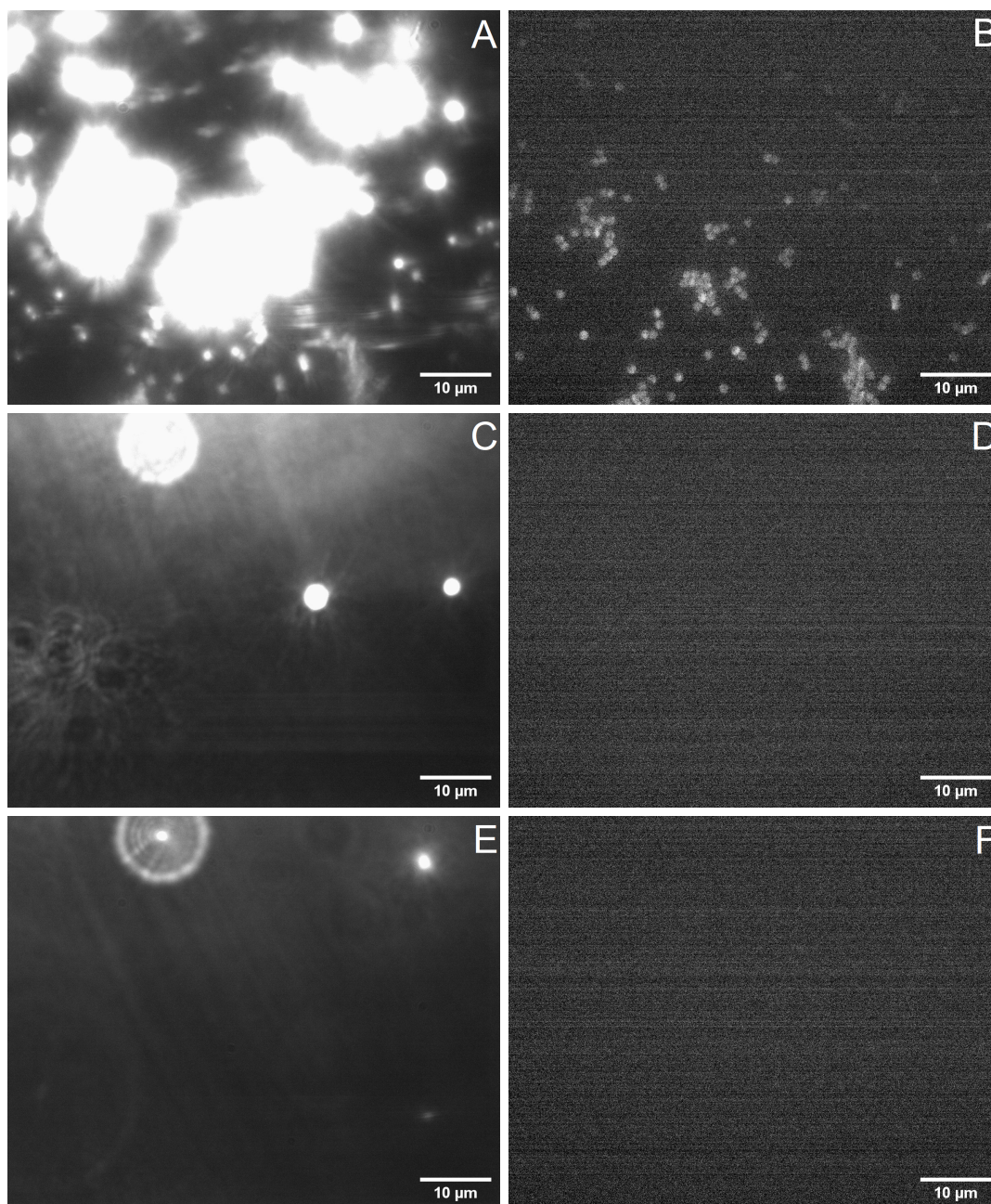


Figura 22 – Na coluna da esquerda (A, C, E) está apresentada a visualização da amostra no regime de epifluorescência. Em (A) é observado uma grande intensidade no plano da amostra, $z = 0$, referente tanto à luminescência das esferas aderidas quanto daquelas em solução. À medida que se muda o plano focal ($z > 0$), ainda é possível observar as esferas em solução (C e E). Na coluna da direita (B, D, F) está apresentado o sistema na condição de TIRF. No plano da amostra, somente a luminescência das esferas aderidas são visíveis. À medida que se muda o plano focal ($z > 0$), nenhuma esfera é visível (D e F).

centenas de nanômetros, o que impede que a observação da fluorescência do volume da amostra.

5.2 Caracterização do campo evanescente

A caracterização do campo evanescente foi feita através da montagem descrita na seção 4.2. Para esta caracterização foram feitas medidas da intensidade do campo evanescente em três posições angulares distintas medidas: (1) $\theta \approx \theta_{C'}$, ou seja, o ângulo de incidência do feixe de excitação possui um valor próximo ao do ângulo crítico imposto pelo sistema; (2) $\theta_{C'} < \theta < \theta_{M'}$ em que o feixe de excitação incide na interface de interesse em um ângulo dentro do intervalo delimitado pelo ângulo crítico $\theta_{C'}$ e o ângulo máximo imposto pelo uso do prisma; e, por fim, (3) $\theta \approx \theta_{M'}$, sendo o valor do ângulo de incidência próximo ao limite angular de visualização do feixe dado pelo prisma reto.

O ângulo máximo de visualização imposto pelo prisma reto é $\theta_{M'} = 73 \pm 5^\circ$, como mostrado no Apêndice. Este ângulo é cerca de 8° menor do que o ângulo máximo de abertura da objetiva ($\theta_M = 81,018 \pm 0,007^\circ$), o que está dentro do esperado. Já o ângulo crítico foi calculado pela Lei de Snell 2.21. Para a interface vidro/ar utilizada durante os experimentos de caracterização do campo evanescente, o ângulo crítico θ_c é dado por:

$$\begin{aligned}\theta_c &= \arcsin(1,00/1,52) \\ \theta_c &= 41 \pm 3^\circ\end{aligned}\tag{5.1}$$

Em que $n_2 = 1,52 \pm 0,03$ é o índice de refração médio dos índices de refração do vidro, $n_V = 1,52 \pm 0,06$, e do óleo, $n_O = 1,5085 \pm 0,0005$. Entretanto, a utilização do prisma impõe um ângulo mínimo, ou um ângulo crítico, de $\theta_{C'} = 45^\circ$, como mostrado pela geometria da figura 23(ver Apêndice).

Determinado o intervalo angular das medições, é possível obter o ângulo de incidência de duas maneiras: (1) através da equação 2.20 após se determinar a profundidade d do campo evanescente, e (2) através de uma medida direta da posição do feixe do campo evanescente incidente sobre um anteparo, como mostrado na figura 23 acima. Segundo a sua análise geométrica, o ângulo de incidência θ_I é dado por (ver Apêndice):

$$\theta_I = 45^\circ + \arcsin(n_1 \sin(\theta_A)/n_2)\tag{5.2}$$

Aplicando os valores de $n_1 = 1,00$ e $n_2 = 1,52 \pm 0,03$ tem-se:

$$\theta_I = 45^\circ + \arcsin(\sin(\theta_A)/1,52)\tag{5.3}$$

O ângulo θ_A é dado em função do ângulo β , que por sua vez é dado por B.7, como demonstrado no Apêndice. Esta análise posta, a determinação da intensidade do campo evanescente em função da distância foi feita através do esquema da figura 20, seguindo os passos abaixo:

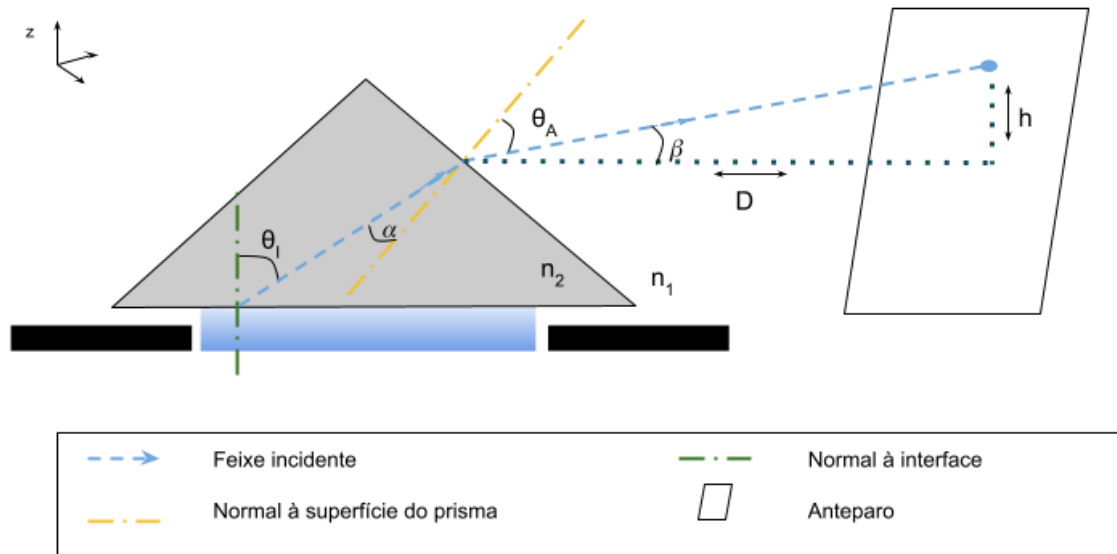


Figura 23 – Representação geométrica dos ângulos utilizados para estimar o ângulo de incidência na interface lâmina/ar.

1. Para o registro da intensidade do campo evanescente em função da distância, foi captada a imagem do feixe por meio de uma câmera CMOS através da gravação de um vídeo de 50 *frames* para cada intervalo de distância estabelecido por meio do piezoelétrico. Este vídeo, por sua vez, teve seu tratamento de imagem submetido ao *software ImageJ* [30], onde foi transformado em uma única imagem correspondente à intensidade média das 50 *frames* inicialmente obtidas para aquele intervalo. A altura do prisma foi, então, variada em passos de 25 nm e, para cada intervalo, o processo acima de obtenção de intensidade média do feixe foi realizado.
2. Ao final das medidas, quando a intensidade do feixe captada pela câmera é zerada, todas as imagens correspondentes aos vídeos obtidos em cada intervalo de distância foram agrupados em um único vídeo, de modo que cada *frame* deste novo vídeo corresponde à intensidade média do feixe evanescente em cada um dos respectivos intervalos de distância medidos. Neste vídeo final, foram selecionadas diversas regiões do feixe e medida a sua intensidade em função da distância.
3. Os valores da intensidade em função da distância foram tratadas no *software Kaleida Graphs* e o ajuste exponencial seguindo a relação 2.20 foi feito.
4. Para cada intervalo angular foi feita uma série de três medidas e em cada uma destas medidas, os processos acima citados foram realizados a fim de que se tenha uma média da intensidade do feixe para cada intervalo de distância sob o regime angular selecionado.
5. Estes intervalos angulares foram medidos em um anteparo tomando como referência o ângulo crítico $\theta_{C'}$ e o ângulo máximo permitido pelo prisma $\theta_{M'}$.

Os resultados obtidos estão demonstrados no gráfico da figura 24. Um ajuste do gráfico sob uma curva exponencial da forma $I(z) = m_1 + m_2 \exp(-z/m_3)$ permite afirmar que o campo evanescente tem um comportamento esperado para os casos $\theta \approx \theta_{C'}$ e $\theta_{C'} < \theta < \theta_{M'}$, representados pelas curvas A e B, respectivamente. A equação 2.20 indica que a relação entre a distância de profundidade d do campo evanescente e o ângulo de incidência θ_I é inversamente proporcional, posto que à medida que se aumenta o ângulo de incidência, a profundidade do campo evanescente decai exponencialmente de forma que o valor máximo de profundidade é obtido quando $\theta = \theta_C$. Em outras palavras, ao aumentar o ângulo de incidência, espera-se que o campo evanescente tenha um decaimento mais rápido do que teria em um ângulo θ próximo ao ângulo crítico, como exemplificado pelas curvas A e B do gráfico. Por outro lado, observa-se um comportamento anômalo quando o ângulo do feixe de incidência se aproxima do limite imposto pelo prisma, que será discutido adiante. Os valores referentes à distância de decaimento para cada intervalo angular está apresentada na tabela 1.

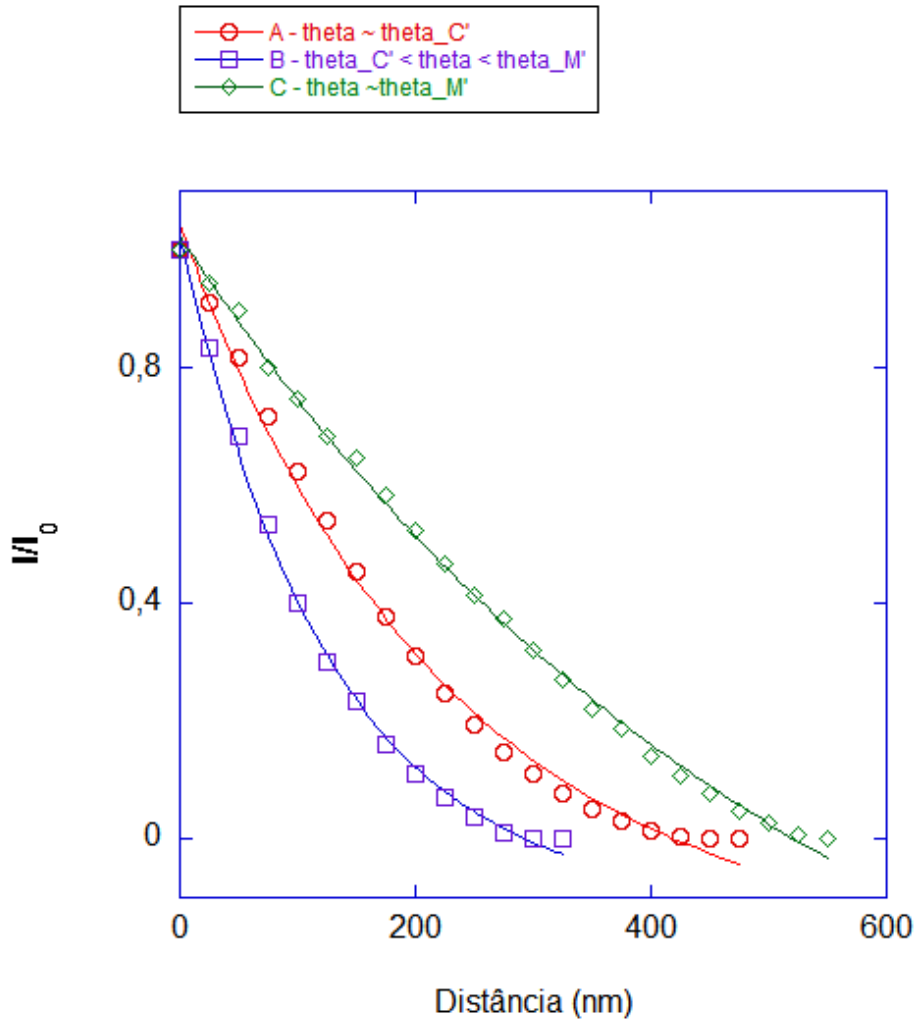


Figura 24 – Gráfico da intensidade em função da distância para três intervalos angulares distintos: $\theta \approx \theta_{C'}$, $\theta_{C'} < \theta < \theta_{M'}$ e $\theta \approx \theta_{M'}$.

Intervalo angular	d (nm)	θ_I teórico ($^\circ$)	θ_I ($^\circ$)	d teórico (nm)
$\theta \approx \theta_c$	224 ± 14	$42,01 \pm 0,01$	67 ± 5	40 ± 100
$\theta_c < \theta < \theta_{M'}$	127 ± 6	$43,61 \pm 0,02$	69 ± 5	39 ± 100
$\theta \approx \theta_M$	556 ± 43	$41,39 \pm 0,001$	71 ± 5	38 ± 100

Tabela 1 – Relação entre a profundidade do campo evanescente e o ângulo de incidência.

De modo geral, a análise qualitativa do gráfico da figura 24 confirma a existência de um campo evanescente gerado na interface lamínula/ar. Os casos A e B apresentados estão dentro dos resultados esperados. Esses valores demonstram o comportamento inversamente proporcional entre a profundidade do campo evanescente e o ângulo de incidência do feixe de excitação. Esses valores corroboram com os valores apresentados na literatura, onde é possível encontrar trabalhos em que a medição da profundidade do campo apresenta valores de algumas dezenas de nanômetros [9, 11, 19, 23].

Por outro lado, análise dos ângulos de incidência indica diferenças discrepantes entre os valores obtidos teoricamente via 2.20, utilizando o valor da profundidade do campo d obtida através ajuste do gráfico, e os valores calculados usando o prisma e a posição do feixe em um anteparo. Os valores dos ângulos de incidência calculados via ajuste gráfico são, inclusive, menores do que o ângulo crítico $\theta_{C'}$ imposto pelo prisma, mas não são menores do que o ângulo crítico θ_C , como esperado. Para entender estas diferenças alguns pontos precisam ser discutidos: (1) Os limites do intervalo angular sob o regime de TIRF medidos no anteparo e (2) o espalhamento do feixe incidente dentro dos componentes ópticos da objetiva.

5.2.1 Limites do intervalo angular medido através de um prisma sob o regime de TIRF

As posições da incidência do feixe no anteparo foram escolhidas entre os seguintes limites qualitativos, como mostrado na figura 25:

- **Limite próximo ao ângulo crítico**

Este limite foi determinado através da reflexão interna total observada na interface lamínula/ar. Antes do prisma ser posicionado sobre a lamínula, o feixe incidente, fora do regime de TIRF, foi observado no anteparo. Em seguida, o ângulo de incidência foi variado fazendo com que este feixe se movesse em direção à base do anteparo até não mais ser observado. A partir deste ângulo, o feixe está em reflexão interna total. O prisma é, então, posto em contato com a lamínula de modo que o feixe foi novamente observado no anteparo. A posição em que o feixe incide no anteparo é marcada e definida como a posição indicada por $\theta_I = \theta_{C'} = 64 \pm 5^\circ$.

- **Limite próximo ao ângulo de abertura máxima**

Em seguida, ainda com o prisma em contato com a lamínula, o ângulo de incidência é aumentado de forma que, como no item anterior, o feixe incidente se moveu em direção à base do anteparo até não mais ser observado. Nesta situação o feixe atingiu uma angulação próxima à angulação máxima permitida pela objetiva. O ângulo de incidência é, então, diminuído até ser possível observar novamente o feixe no anteparo. Essa posição é marcada e definida como a posição indicada por $\theta_I = \theta_{M'} = 73 \pm 5^\circ$.

- **Ângulo intermediário**

O ângulo intermediário foi escolhido visualmente entre as posições 1 e 3 do anteparo 25.

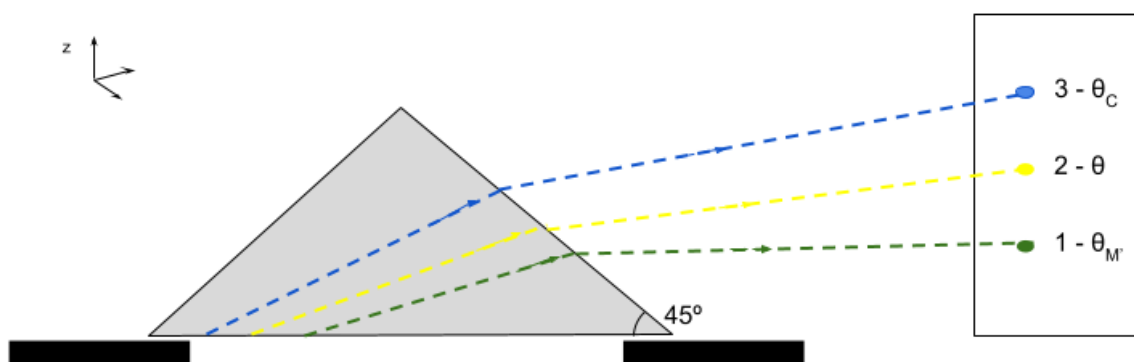


Figura 25 – Representação da posição dos feixes sob os ângulos: (1) Ângulo crítico $\theta_{C'}$, (2) $\theta_{C'} < \theta < \theta_{M'}$ e (3) $\theta_{M'}$.

Tem-se, portanto, um pequeno intervalo angular disponível para medições. Os valores contidos neste intervalo, entretanto, estão de acordo com os valores de ângulo de incidência medidos com um prisma reto e relatados na literatura [23]. Por outro lado, os ângulos obtidos via ajuste gráfico apresentam diferenças discrepantes em relação aqueles calculados via prisma, mas ainda assim refletem o estreito intervalo angular obtido experimentalmente, e estão de acordo com as estimativas apresentadas na literatura pelo método de determinação via profundidade do campo [25, 29]. Afirma-se, contudo, que a precisão destes ângulos obtidos via ajuste é mais adequada do que a dos ângulos obtidos via prisma, uma vez que os valores angulares correspondem à distâncias de profundidade efetivamente medidas, que estão dentro de um intervalo esperado e com incertezas satisfatórias. É razoável, pois, admitir que a medição do ângulo de incidência através de um prisma reto não é a medição ideal desta grandeza, posto que há uma limitação

angular imposta pelo próprio sistema de modo que os seus valores não refletem de forma precisa os valores de profundidade do campo evanescente medidos experimentalmente. Somado a isso, estes valores de ângulo de incidência fornecem uma alta incerteza para d calculado teoricamente, o que reforça a afirmação feita. Por outro lado, estas medidas fornecem uma boa estimativa qualitativa do limite angular superior do sistema, de forma a impedir que o ângulo de incidência seja extrapolado para além do limite do sistema durante a preparação da montagem para experimentos futuros e a garantir o posicionamento do feixe de forma a ter uma distância de profundidade otimizada para experimentos envolvendo o estudo de amostras biológicas.

5.2.2 O espalhamento do feixe incidente

Um fator que pode afetar a obtenção dos valores exatos dos ângulos incidentes e, consequentemente, os valores da profundidade do campo evanescente é o espalhamento da luz dentro da objetiva. Este espalhamento é causado tanto pelo tamanho da região focal gerada pela lente responsável por focalizar o feixe no BFP quanto pela difração que o feixe sofre dentro dos componentes ópticos da objetiva que, por sua vez, também atrapalha a focalização do feixe no BFP e sua respectiva colimação resultando, assim, em uma região de ângulos de incidência, como mostra a figura abaixo 26.

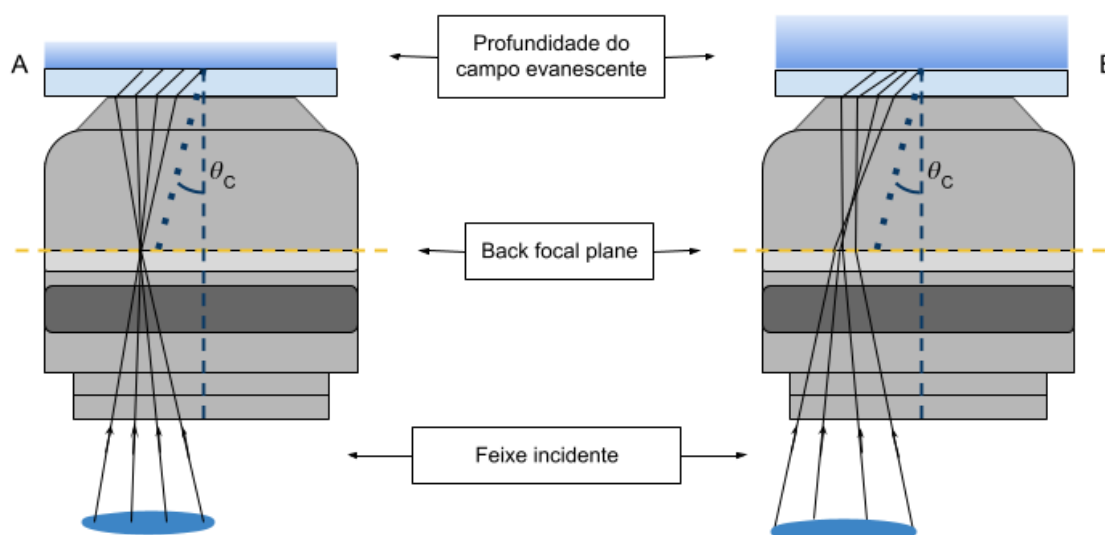


Figura 26 – Comparação entre as regiões focais de tamanhos diferentes e sua relação com os ângulos de incidência. Em (A) há uma região focal menor o que, por sua vez, resulta em um feixe mais colimado, com uma menor distribuição de ângulos de incidência e, portanto, uma menor profundidade do campo evanescente quando comparado com situações não ideais. Em (B) a região focal é mais ampla resultando em um feixe menos colimado, uma maior distribuição de ângulos de incidência e, por sua vez, uma maior profundidade do campo evanescente.

O espalhamento gerado pelo tamanho da região focal localizada no BFP da objetiva pode ser explicado ao compreender que, o feixe incidente, apesar de colimado e focalizado

no BFP, não é definido como um ponto no espaço, mas sim como um objeto caracterizado por uma área de secção reta contido na região focal da objetiva. Utilizando a aproximação paraxial e tratando-se de um feixe puramente gaussiano, esta área de secção transversal é caracterizada por um valor de raio mínimo. Este raio mínimo é chamado de cintura mínima do feixe w_0 . À medida que se afasta da região central deste feixe, a largura da cintura varia em função da distância z do eixo de propagação, como mostra a figura 27.

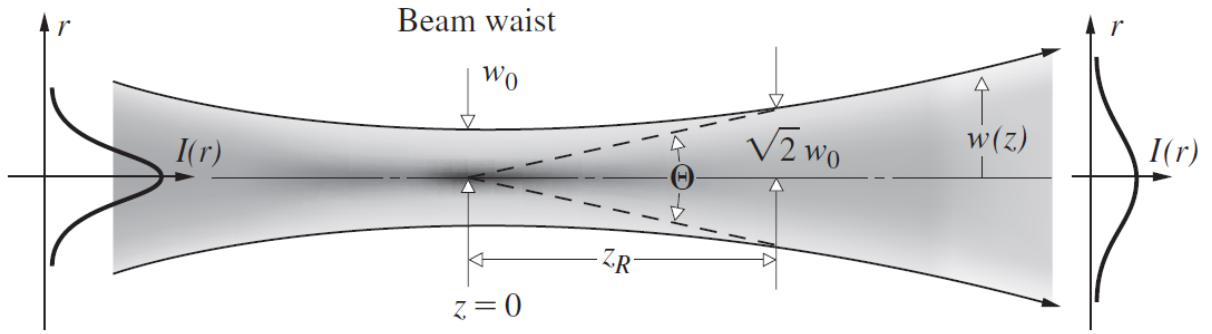


Figura 27 – Alargamento do feixe gaussiano em função da distância z do eixo de propagação. A cintura mínima w_0 do feixe é definida no ponto $z = 0$. O intervalo de divergência Θ é definido sob a condição de $\Theta \approx 2w(z)/z$. Imagem retirada de [14].

A variação da cintura do feixe gaussiano em função da distância é dada por:

$$w(z) = w_0 \left[1 + \left(\frac{z}{z_R} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (5.4)$$

Em que w_0 é a largura mínima da cintura do feixe, λ é o comprimento de onda e z_R é o comprimento de Rayleigh. Este comprimento é definido como o valor de z no qual a área de secção transversal do feixe dobra de tamanho. Em outras palavras, é o valor de z em que a cintura do feixe corresponde a $\sqrt{2}w_0$. Dessa forma tem-se:

$$w(z) = \sqrt{2}w_0 = w_0 \left[1 + \left(\frac{z}{z_R} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (5.5)$$

$$z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$$

A relação 5.4 pode ser reescrita como:

$$w(z) = w_0 \left[1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi(w_0)^2} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (5.6)$$

A região angular que caracteriza este feixe em pontos distantes da sua cintura, ou seja, pontos em que $z \gg z_R$, é aproximada por $\Theta \approx 2w(z)/z$. De acordo com esta aproximação, tem-se que $z \gg w_0$ de modo que o segundo termo de 5.6 é muito maior do que 1. Logo:

$$w(z) \approx \frac{\lambda z}{\pi w_0} \quad (5.7)$$

O comprimento angular, portanto, é dado por:

$$\Theta \approx \frac{2w(z)}{z} \quad (5.8)$$

$$\Theta \approx \frac{2\lambda}{\pi w_0}$$

Tomando $\Theta = 2NA$, sendo NA a abertura numérica da objetiva, tem-se que a cintura do feixe no plano focal é dada por:

$$w_0 = \frac{\lambda}{\pi NA} \quad (5.9)$$

Nos experimentos realizados foi utilizada uma objetiva Nikon, Apo TIRF, 100x e 1,49 de abertura numérica e um feixe de comprimento de onda $\lambda = 488nm$. Em condições ideais, um feixe puramente gaussiano focalizado por essa objetiva terá sua cintura mínima de feixe localizada exatamente no plano focal (ou BFP) deste componente óptico ($z = 0$). Com base nisso, a cintura mínima do feixe na região focal é estimada, através da equação 5.9, como sendo:

$$w_0 = 104,0nm \quad (5.10)$$

Este valor informa que a objetiva utilizada durante os experimentos possui um pequeno foco, como esperado. No caso do TIRF, onde trata-se de um campo evanescente, este pequeno foco garante um feixe confinado em uma região menor, que por sua vez garante uma profundidade de campo menor, uma vez que manterá os feixes mais colimados e assim diminuirá a região de ângulos de incidência. Esta situação é a ideal para o TIRF, pois uma profundidade menor do campo evanescente aumenta a resolução espacial obtida através da técnica. Além disso, exemplifica-se a importância de objetivas de alta abertura numérica para o uso do TIRF, posto que a relação 5.9 demonstra que quanto maior a abertura numérica de uma lente ou de um conjunto de lentes, como a objetiva, menor será a cintura do feixe e, portanto, melhor focalizado ele será.

Como visto, nas montagens experimentais do TIRF, o feixe gaussiano não é focalizado pela objetiva em si, mas uma lente convergente externa ao microscópio é a responsável pela focalização deste feixe no BFP da objetiva. É preciso, portanto, estimar o valor da cintura do feixe focalizado por esta lente externa e analisar como ela se compara com a cintura mínima gerada pela objetiva. Para uma lente simples, como a utilizada, a cintura do feixe pode ser aproximada por (ver Apêndice):

$$w'_0 = \frac{4\lambda f}{\pi D} \quad (5.11)$$

Em que f é o foco da lente e D é o diâmetro inicial do feixe incidido sobre este componente. Esta relação evidencia que lentes com focos maiores irão gerar feixes focalizados de cinturas maiores, o que não é interessante para o caso do TIRF. No presente trabalho, $f = 100 \pm 1mm$ e $D = 20 \pm 8mm$. Logo, estima-se uma cintura mínima de:

$$w'_0 = 1,6 \pm 0,3\mu m \quad (5.12)$$

Esta estimativa mostra que a região focal gerada pela lente externa ao microscópio é cerca de 15 vezes maior do que a região focal ideal definida pela objetiva. Uma região focal maior, por sua vez, produz uma distância de profundidade maior do campo evanescente, posto que o feixe não irá incidir na interface objetiva/amostra perfeitamente colimado, o que irá gerar uma certa distribuição de vetores de onda $\mathbf{k}$ nesta interface onde nem todos os vetores estarão em uma mesma angulação, como mostrado em 26. Isto irá ocasionar no fato de que nem todos os feixes irão incidir na interface sob a condição de reflexão interna total e aqueles sob esta condição não necessariamente estarão em uma mesma angulação em relação ao eixo óptico. Em outras palavras, haverá um ângulo incidente efetivo, referente à esta distribuição de $\mathbf{k}$, incidindo na interface objetiva/amostra que pode não corresponder ao ângulo incidente previamente definido durante a montagem.

Toda esta análise, por sua vez, pode fornecer explicações referentes ao caso C representado no gráfico. Neste caso há um comportamento anômalo: a profundidade do campo evanescente aumenta consideravelmente quando o ângulo de incidência se aproxima de $\theta_{M'}$. Apesar de uma análise quantitativa do ângulo de incidência medido via prisma não ser ideal, a sua análise qualitativa continua satisfatória uma vez que é possível afirmar que o ângulo θ , referente à figura 25, está em um intervalo entre $\theta_{C'}$ e $\theta_{M'}$, ou seja, $\theta_{C'} < \theta < \theta_{M'}$, e que este $\theta_{M'}$ possui um valor próximo ao valor máximo limitado pelo sistema. Esta afirmação se baseia no comportamento esperado de visualização do feixe no anteparo ao estabelecer estes limites e pelo comportamento da profundidade d apresentada nos casos A e B. Dito isso, como $\theta_{C'} < \theta_{M'}$, espera-se que $d_{C'} > d_{M'}$, porém não é isto que é observado, uma vez que $d_{M'}$ é cerca de 2,5x maior do que $d_{C'}$. Uma possível explicação para esta discrepância se dá no fato de que o feixe de excitação está incidindo em uma

região perto da borda das lentes que compõem a objetiva de modo que o espalhamento nesta região é mais intenso devido aos efeitos de bordas, difração e de aberrações ópticas. Estes efeitos irão ocasionar em um maior espalhamento do feixe dentro da objetiva o que, por sua vez, irá impedir que o feixe seja colimado de forma satisfatória, aumentando assim a distribuição de vetores de onda incidentes da interface de modo que seja possível haver feixes transmitidos e não somente um campo evanescente quase puro. Entretanto, maiores afirmações sobre essa anomalia devem ser feitas sob resultados de outras técnicas experimentais, o que pode corroborar para um novo limite superior da abertura angular disponível para o TIRF.

Por fim, toda esta discussão permite afirmar que a medição do ângulo de incidência não é uma medida trivial de ser obtida com precisão satisfatória. O método de medição deste ângulo via prisma não é o ideal a ser feito neste sistema, uma vez que fornece uma incerteza muito alta para a profundidade do campo d calculado teoricamente através deste ângulo, além de limitar consideravelmente o intervalo angular disponível para medições. Por outro lado, o valor da profundidade do campo evanescente medido através do fenômeno de reflexão interna total frustrada se mostra dentro da faixa esperada e com uma incerteza satisfatória, sendo, portanto, uma confirmação de que a montagem descrita no capítulo 4 é bem sucedida e passível de ser utilizada em amostras biológicas, como proposto inicialmente, posto que há a geração de um campo evanescente de profundidade na ordem de algumas centenas de nanômetros.

Estes resultados também corroboram para a afirmação de que o espalhamento nos componentes ópticos é uma característica intrínseca às montagens para se ter acesso à microscopia TIRF via objetiva. Entretanto, apesar deste espalhamento, a montagem óptica apresenta uma ótima resolução espacial definida pela profundidade do campo evanescente no regime de TIRF, uma vez que uma resolução mínima de $d = 127 \pm 6nm$ foi alcançada e se encontra dentro da faixa utilizada para o imageamento de amostras biológicas. Por conseguinte, este espalhamento deve ser entendido tanto a fim de ser minimizado quanto para as interpretações de resultados de experimentos a serem realizados, uma vez que este fenômeno também caracteriza a distância de profundidade do campo evanescente sob o qual a amostra biológica será submetida.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho mostramos o passo-a-passo da montagem óptica responsável por acoplar a funcionalidade da microscopia TIRF via objetiva em um microscópio invertido assim como dois testes de qualidade: (1) o teste padrão envolvendo microesferas fluorescentes e (2) um teste adicional que se baseia na caracterização campo evanescente através da análise de sua distância de profundidade. Os resultados destes testes corroboram para a reprodutibilidade das montagens experimentais do TIRF e elucidam o comportamento evanescente do campo gerado através do fenômeno de reflexão interna total.

Posteriormente foram discutidos os fatores que podem influenciar no espalhamento do feixe incidente dentro dos componentes ópticos do sistema e como este efeito é intrínseco às montagens via objetiva impedindo, portanto, que o campo evanescente gerado pelo fenômeno de reflexão interna total na interface entre dois meios através deste método seja puramente evanescente. Entender as causas deste espalhamento permite otimizar a montagem experimental de forma a reduzi-lo e, assim, aumentar a resolução da técnica. Este espalhamento, entretanto, não é um impasse para a análise de amostras via microscopia TIRF, uma vez que foram obtidas distâncias de profundidades satisfatórias e que permitem o imageamento de filmes finos e de estruturas biológicas aderidas em escala nanométrica, o qual é o principal objetivo da montagem realizada. Por fim, abriu-se uma nova possibilidade de investigação sobre o comportamento angular do feixe incidente no limite imposto pela abertura numérica do sistema e como este efeito se relaciona com toda a teoria por trás da microscopia TIRF.

Os próximos passos do trabalho seguem em direção ao uso da microscopia TIRF aplicada em amostras biológicas com o intuito de realizar estudos sobre a dinâmica de membranas. A figura 28 ilustra, para fins de curiosidade, os primeiros passos da utilização do TIRF em amostras contendo mioblastos cardíacos marcados com Alexa Fluor.

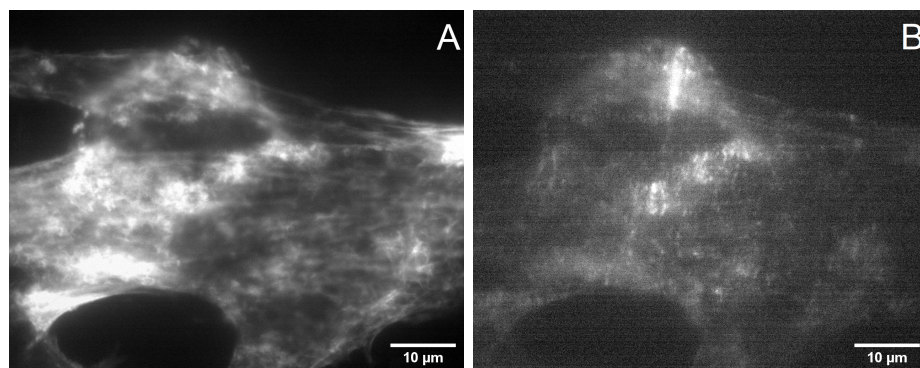


Figura 28 – Mioblastos cardíacos, H9c2, marcados com *Alexa Fluor 488* iluminados via (A) epifluorescência e (B) TIRF.

REFERÊNCIAS

- [1] Axelrod D Holz RW. Abbineni PS, Bittner MA. Chromogranin a, the major luminal protein in chromaffin granules, controls fusion pore expansion. *The Journal of general physiology vol. 151,2: 118-130.*, 2019. Citado na página 12.
- [2] Chapman ER Holz RW Axelrod D. Abbineni PS, Briguglio JS. Vamp2 and synaptotagmin mobility in chromaffin granule membranes: implications for regulated exocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 33(6):ar53, 2022. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 13.
- [3] Axelrod D Holz RW. Allersma MW, Wang L. Visualization of regulated exocytosis with a granule-membrane probe using total internal reflection microscopy. *Molecular biology of the cell vol. 15,10: 4658-68.*, 2004. Citado na página 12.
- [4] Axelrod D. Axelrod JJ. Light scattering in tirf microscopy: A theoretical study of the limits to surface selectivity. *Biophysical journal*, 120(15), 2952–2968., 2021. Citado na página 14.
- [5] Hérault K Tourain C Oheim M. Brunstein M, Teremetz M. Eliminating unwanted far-field excitation in objective-type tirf. part i. identifying sources of nonevanescant excitation light. *Biophys J.*;106(5):1020-1032., 2014. Citado na página 14.
- [6] Tourain C Oheim M. Brunstein M, Teremetz M. Combined evanescent-wave excitation and supercritical-angle fluorescence detection improves optical sectioning. *arXiv preprint arXiv:1302.1615*, 2013. Citado na página 14.
- [7] Axelrod D. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *Cell Biol*, 89(1):141–145, 1981. Citado na página 13.
- [8] Axelrod D. Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives. *J Biomed Opt.*,6(1):6-13., 2001. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 13.
- [9] Axelrod D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Methods in enzymology*, 361:1–33, 2003. Citado 8 vezes nas páginas 13, 15, 16, 19, 24, 25, 30 e 47.
- [10] Axelrod D. Fluorescence excitation and imaging of single molecules near dielectric-coated and bare surfaces: a theoretical study. *Journal of microscopy*, 247(2), 147–160, 2012. Citado na página 13.
- [11] Axelrod D. Evanescent excitation and emission in fluorescence microscopy. *Biophys J.*;104(7):1401-1409, 2013. Citado na página 47.

-
- [12] Axelrod D. Total internal reflection fluorescence (tirf) and evanescence microscopies. *IOP Publishing*, 2022. Citado 3 vezes nas páginas 12, 14 e 27.
- [13] Axelrod D Holz RW. Degtyar VE, Allersma MW. Increased motion and travel, rather than stable docking, characterize the last moments before secretory granule fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(40):15929–15934, 2007. Citado na página 13.
- [14] Hecht E. Optics. *Pearson Education, Fifth Edition - Global Edition*, 2017. Citado 4 vezes nas páginas 32, 50, 66 e 67.
- [15] Grant R. Fowles. Introduction to modern optics. *Dover Publications*, 2015. Citado 4 vezes nas páginas 17, 18, 19 e 20.
- [16] Enderlein J Diez S. Gell C, Berndt M. Tirf microscopy evanescent field calibration using tilted fluorescent microtubules. *J Microsc.*;234(1):38-46., 2009. Citado na página 14.
- [17] Anvari B Brownell WE Saggau P. Gliko O, Reddy GD. Standing wave total internal reflection fluorescence microscopy to measure the size of nanostructures in living cells. *J. Biomed. Opt.* 11(6) 064013, 2006. Citado na página 14.
- [18] Roma PM et al. Hissa B, Pontes B. Membrane cholesterol removal changes mechanical properties of cells and induces secretion of a specific pool of lysosomes. *PLoS One*. 2013;8(12):e82988., 2013. Citado na página 12.
- [19] Fish KN. Total internal reflection fluorescence (tirf) microscopy. *Curr Protoc Cytom*, Chapter 12:Unit12.18, 2009. Citado 6 vezes nas páginas 12, 13, 14, 15, 19 e 47.
- [20] Asbury CL Kudalkar EM, Davis TN. Single-molecule total internal reflection fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor protocols vol. 2016*, 5 pdb.top077800., 2 May. 2016. Citado na página 13.
- [21] Oheim M Loerke D, Stühmer W. Quantifying axial secretory-granule motion with variable-angle evanescent-field excitation. *Journal of Neuroscience Methods, Volume 119, Issue 1, 65-73*, 2002. Citado na página 13.
- [22] Oheim M. Tirf (total internal reflection fluorescence). *eLS, John Wiley Sons, Ltd (Ed.)*, 2016. Citado na página 13.
- [23] Axelrod D. Mattheyses AL. Direct measurement of the evanescent field profile produced by objective-based total internal reflection fluorescence. *J Biomed Opt.*;11(1):014006., 2006. Citado 3 vezes nas páginas 14, 47 e 48.

- [24] Rappoport JZ Mattheyses AL, Simon SM. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. *J Cell Sci*, 123(Pt 21):3621–3628, 2010. Citado 5 vezes nas páginas 8, 12, 15, 16 e 19.
- [25] Mücke J Heymann M Lambacher A Schille P. Niederauer C, Blumhardt P. Direct characterization of the evanescent field in objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Optics express vol. 26,16: 20492-20506.*, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 48.
- [26] Tanaka T Ishida H Nagamatsu S Ohara-Imaizumi M, Nakamichi Y. Imaging exocytosis of single insulin secretory granules with evanescent wave microscopy: Distinct behavior of granule motion in biphasic insulin release*210,. *Journal of Biological Chemistry, Volume 277, Issue 6, 3805-3808*, 2002. Citado na página 13.
- [27] Jaykumar AB Caceres PS Sablaban I Tannous BA Ortiz PA. Real-time monitoring of nkcc2 endocytosis by total internal reflection fluorescence (turf) microscopy. *American journal of physiology. Renal physiology vol. 310,2*, 2016. Citado na página 12.
- [28] Kirchhausen T. Saffarian S. Differential evanescence nanometry: live-cell fluorescence measurements with 10-nm axial resolution on the plasma membrane. *Biophys J.;94(6):2333-2342.*, 2008. Citado na página 14.
- [29] Fernandez JM. Sarkar A, Robertson RB. Simultaneous atomic force microscope and fluorescence measurements of protein unfolding using a calibrated evanescent wave. *Proc Natl Acad Sci U S A.;101(35):12882-12886.*, 2004. Citado na página 48.
- [30] Eliceiri K. Schneider C, Rasband W. Nih image to imagej: 25 years of image analysis. *Nat Methods 9, 671–675*, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 40 e 45.
- [31] Teste de qualidade da montagem utilizando microesferas fluorescentes. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1gv48nXcrwuJ5pwFGTwf cadR8L4RV8W2P/view?usp=sharing>. Citado na página 41.
- [32] Puthenveedu MA. Soohoo AL, Bowersox SL. Visualizing clathrin-mediated endocytosis of g protein-coupled receptors at single-event resolution via turf microscopy. *Journal of visualized experiments : JoVE ,92 e51805.*, 2014. Citado na página 12.
- [33] Almers W. Steyer JA. Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys J.;76(4):2262-2271.*, 1999. Citado na página 14.
- [34] Axelrod D. Stout AL. Evanescent field excitation of fluorescence by epi-illumination microscopy. *Appl Opt.;28(24):5237-5242.*, 1989. Citado na página 13.

-
- [35] Axelrod D. Sund SE. Actin dynamics at the living cell submembrane imaged by total internal reflection fluorescence photobleaching. *Biophys J.*;79(3):1655-1669., 2000. Citado na página 13.
- [36] Burghardt TP. Measuring incidence angle for through-the-objective total internal reflection fluorescence microscopy. *J Biomed Opt.*;17(12):126007., 2012. Citado na página 14.

Apêndices

APÊNDICE A – Ângulo Máximo de Incidência

A.1 Prisma Equilátero

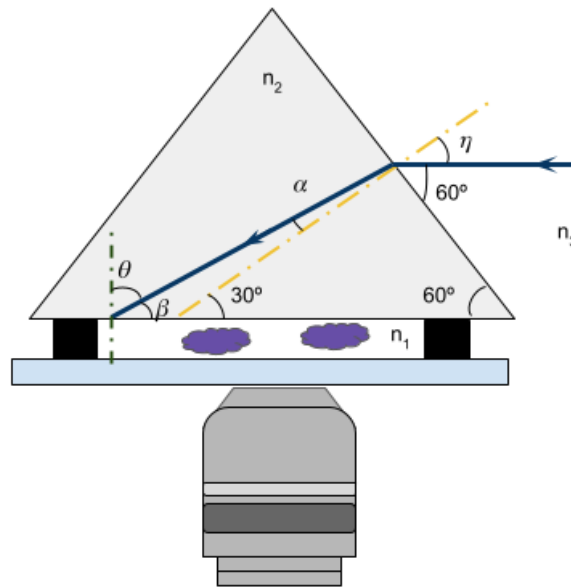


Figura 29 – Esquematização geométrica referente ao feixe de incidência em um prisma equilátero, 60° – 60° – 60°, referente à uma configuração da microscopia TIRF em um microscópio invertido, sendo o prisma posicionado sobre a amostra.

Como esquematizado na figura 29, o ângulo máximo em que se pode direcionar o feixe, que se encontra no ar ($n_3 = 1,00$) sobre o prisma ($n_2 = 1,52$) para que se tenha reflexão interna total na interface prisma/amostra é de 60°. Dito isto, as seguintes relações são retiradas através da análise geométrica da figura:

$$\begin{aligned}\eta &= 30^\circ \\ \alpha + \beta &= 30 \\ \theta &= 90^\circ - \beta = 60^\circ + \alpha\end{aligned}\tag{A.1}$$

Aplicando a Lei de Snell 2.16 para os meios n_3 e n_2 e utilizando as relações acima, tem-se:

$$\begin{aligned}\sin(30) &= 1,52\sin(\alpha) \\ \alpha &\approx 19,20^\circ \\ \theta &\approx 79^\circ\end{aligned}\tag{A.2}$$

Logo, o ângulo máximo de incidência na interface prisma/amostra é de $\theta \approx 79^\circ$.

A.2 Prisma Reto

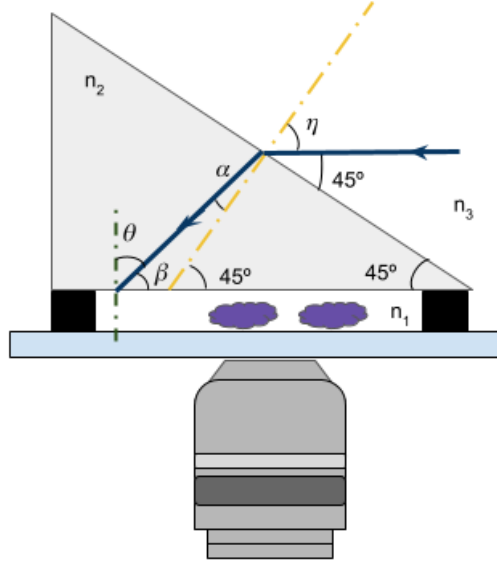


Figura 30 – Esquematização geométrica referente ao feixe de incidência em um prisma reto, $45^\circ - 45^\circ - 90^\circ$, referente à uma configuração da microscopia TIRF em um microscópio invertido, sendo o prisma posicionado sobre a amostra.

Neste caso, o ângulo máximo em que se pode direcionar o feixe de excitação sobre o prisma é de 45° , como mostrado na 30. A partir disso, como feito anteriormente, as seguintes relações são obtidas:

$$\begin{aligned}\eta &= 45^\circ \\ \alpha + \beta &= 45^\circ \\ \theta &= 90^\circ - \beta = 45^\circ + \alpha\end{aligned}\tag{A.3}$$

Aplicando a Lei de Snell 2.16 para os meios n_3 e n_2 e utilizando as relações acima, tem-se:

$$\begin{aligned}\sin(45) &= 1,52\sin(\alpha) \\ \alpha &\approx 28,00^\circ \\ \theta &\approx 73^\circ\end{aligned}\tag{A.4}$$

Logo, o ângulo máximo de incidência na interface prisma/amostra é de $\theta \approx 73^\circ$.

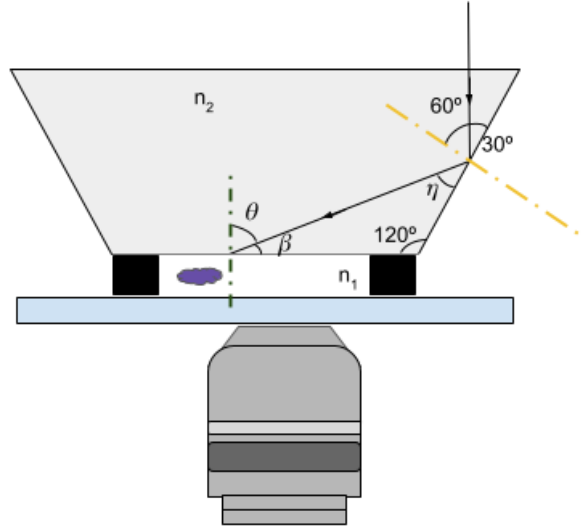


Figura 31 – Esquematização geométrica referente ao feixe de incidência em um prisma trapezoidal de 60° referente à uma configuração da microscopia TIRF em um microscópio invertido, sendo o prisma posicionado sobre a amostra.

A.3 Prisma Trapezoidal

Em um prisma trapezoidal de 60° o feixe de laser, incidindo na vertical, irá fazer um ângulo de 30° com a superfície inclinada do prisma. O ângulo de incidência, medido em relação à normal à essa superfície, é fixado em 60° . Pela lei da reflexão 2.12, $\eta = 30^\circ$. Dessa forma, tem-se:

$$\begin{aligned}\beta &= 30^\circ \\ \theta &= 90^\circ - \beta = 60^\circ\end{aligned}\tag{A.5}$$

Entretanto, um ângulo de $\theta = 60^\circ$ não é suficiente para gerar reflexão interna total, se considerar a amostra como um meio aquoso de $n_1 \approx 1,33$, pois, pela lei de Snell 2.16:

$$\begin{aligned}1,52 \sin(\theta_C) &= 1,33 \sin(90^\circ) \\ \theta_c &\approx 61^\circ\end{aligned}\tag{A.6}$$

Portanto, ao utilizar um prisma trapezoidal de 60° de $n > n_2$, por exemplo, um vidro tipo silicato de $n = 1,66$, é possível obter a reflexão interna total na interface entre este prisma e a amostra:

$$\begin{aligned}1,66 \sin(\theta_C) &= 1,33 \sin(90^\circ) \\ \theta_c &\approx 53^\circ\end{aligned}\tag{A.7}$$

APÊNDICE B – Determinação do Ângulo de Incidência Para a Medição da Distância de Profundidade do Campo Evanescente

O cálculo do ângulo de incidência θ_I foi feito seguindo a geometria abaixo:

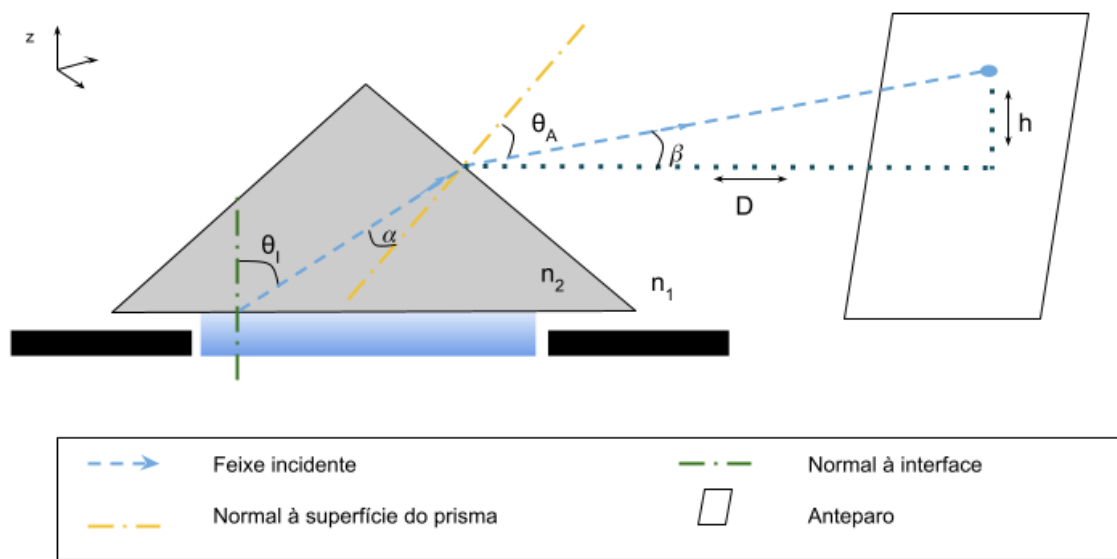


Figura 32 – Esquematização geométrica referente à medição do feixe de incidência em um prisma reto.

A análise geométrica da figura estabelece as seguintes relações entre os ângulos:

$$\begin{aligned}\theta_A &= 45^\circ - \beta \\ \theta_I &= 45^\circ + \alpha\end{aligned}\tag{B.1}$$

Em que $\beta > 0$. Os ângulos α e θ_A se relacionam pela lei de Snell:

$$n_1 \sin(\theta_A) = n_2 \sin(\alpha)\tag{B.2}$$

Portanto, aplicando B.1 em B.2, o ângulo de incidência é dado por:

$$\theta_I = 45^\circ + \arcsin(n_1 \sin(\theta_A)/n_2)\tag{B.3}$$

O ângulo θ_A foi calculado pela relação $\theta_A = 45 - \beta$. O ângulo β , por sua vez, foi calculado ao medir a distância c e a partir dela os valores de a e b . A partir da figura 33 tem-se:

$$\begin{aligned} a &= c \sin(45^\circ) \\ b &= c \cos(45^\circ) \end{aligned} \quad (\text{B.4})$$

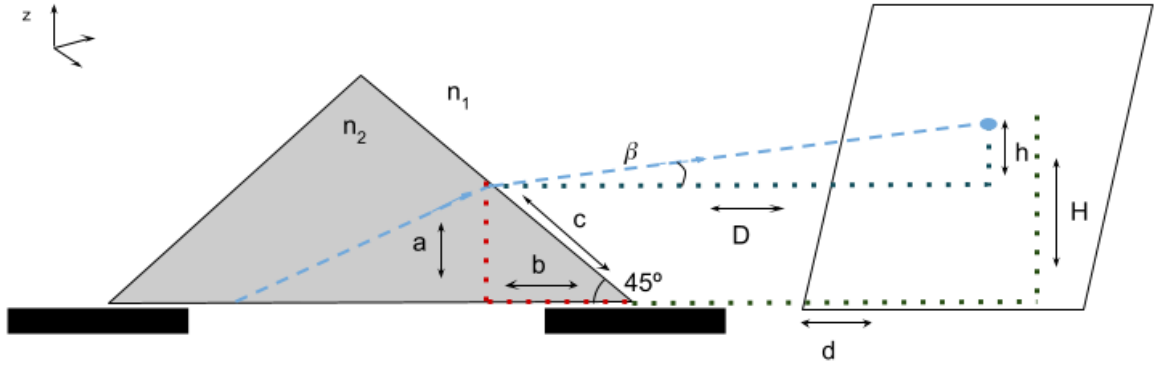


Figura 33 – Esquematização geométrica referente à medição do ângulo β . As medidas de ângulo e comprimento estão exageradas a fim de facilitar a visualização.

O ângulo β é dado por:

$$\tan(\beta) = \frac{h}{D} \quad (\text{B.5})$$

Os valores de h e d são dados por:

$$\begin{aligned} h &= H - a = H - c \cdot \sin(45^\circ) \\ D &= b + d = c \cdot \cos(45^\circ) + d \end{aligned} \quad (\text{B.6})$$

Portanto,

$$\beta = \arctan \left[\frac{H - c \cdot \sin(45^\circ)}{d + c \cdot \cos(45^\circ)} \right] \quad (\text{B.7})$$

Uma ressalva é necessária a fim de compreender o valor angular máximo $\theta_{M'}$ imposto pelo prisma. Nas análises, assumiu-se valores de $\beta < 0$ de modo que $H > a \sin(45^\circ)$ e $\theta_A < 45^\circ$. A princípio, β pode assumir valores negativos, o que leva à condição de que $H < a \sin(45^\circ)$ e $\theta_A > 45^\circ$, como mostra a figura 34.

Entretanto, o caso $\beta < 0$ não é observado experimentalmente, uma vez que o feixe desaparece no anteparo antes de atingir esta condição indicando, assim, que o sistema

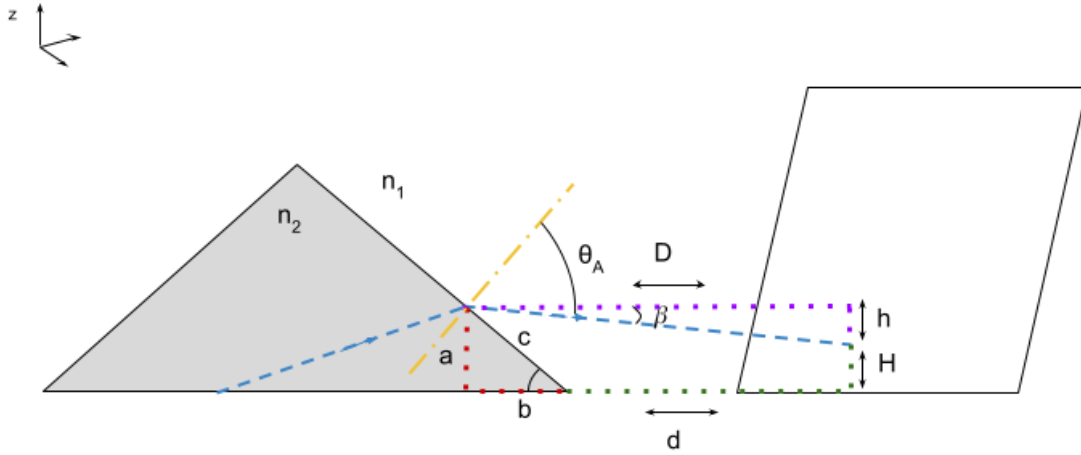


Figura 34 – Esquematização geométrica referente ao intervalo $\beta < 0$. As medidas de ângulo e comprimento estão exageradas a fim de facilitar a visualização.

está na condição de $\beta > 0$. Desta forma, impõe-se um ângulo de incidência máximo $\theta_{M'}$ limitado pela observação do feixe no anteparo. Este ângulo é caracterizado pelo valor de $\theta_A = 45^\circ$, o que fornece um ângulo de incidência máximo $\theta_{M'} = 73 \pm 5^\circ$ que, por sua vez, é próximo do ângulo máximo imposto pela objetiva $\theta_M = 81,018 \pm 0,007^\circ$.

APÊNDICE C – Determinação da Cintura de um Feixe Focalizado Por uma Lente

A expressão 5.12, utilizada para o cálculo da cintura do feixe focalizado no BFP por uma lente externa ao microscópio, é derivada do fenômeno de difração de Fraunhofer por uma abertura circular de raio a . Esta expressão está relacionada ao valor do raio do primeiro disco de Airy gerado pela difração. Para compreender esta análise, supõe-se um feixe de ondas planas incidindo em um plano Σ contendo uma abertura circular de raio a , cujo padrão de difração é observado em um plano distante σ , como mostra a figura 35. O uso de uma lente colimadora, posicionada perto da abertura circular, permite deslocar o plano σ para perto do plano Σ , mantendo o padrão de difração inalterado, como ocorre em sistemas de microscópio.

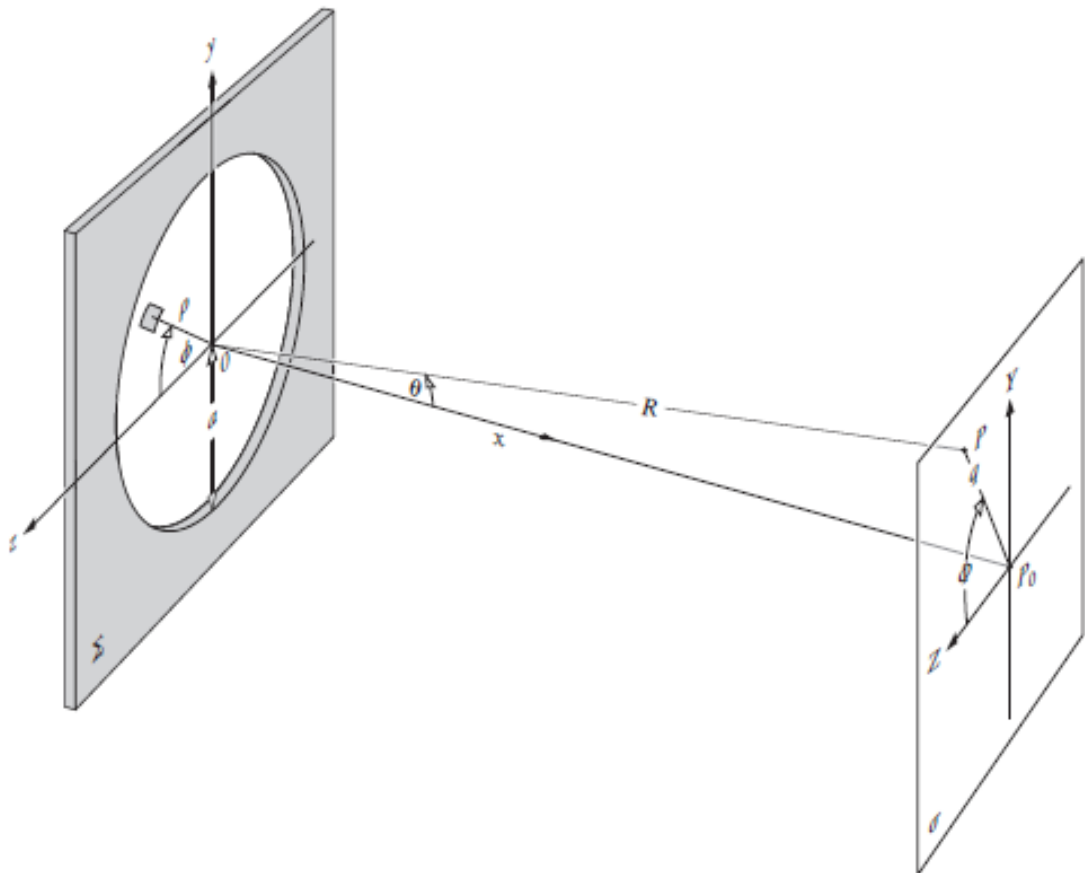


Figura 35 – Esquemática geométrica do plano Σ correspondente à uma abertura circular de raio a cujo padrão de difração é observado em um plano σ . Imagem retirada de [14].

A perturbação óptica causada por esta abertura circular é dada por [14]:

$$\mathbf{E}_p = \frac{\epsilon_A e^{i(\omega t - kR)}}{R} \int_0^a \int_0^{2\pi} e^{i(k\rho q/R)\cos(\phi)} \rho d\rho d\phi \quad (\text{C.1})$$

Em que ϵ_A é a intensidade da fonte por unidade de área. A solução da integral em ϕ é dada pela função de Bessel de ordem zero:

$$J_0(w) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{iwc\cos(v)} dv \quad (\text{C.2})$$

Sendo $w = k\rho q/R$, a expressão C.1 pode ser reescrita como:

$$\mathbf{E}_p = \frac{\epsilon_A e^{i(\omega t - kR)} 2\pi}{R} \int_0^a J_0(k\rho q/R) \rho d\rho \quad (\text{C.3})$$

A integral acima pode ser resolvida utilizando a seguinte propriedade das funções de Bessel:

$$\frac{d}{d\eta}(\eta^m J_m(\eta)) = \eta^m J_{m-1}(\eta) \quad (\text{C.4})$$

De modo que:

$$\int_0^{\eta'} \frac{d}{d\eta'}(\eta'^m J_m(\eta')) d\eta' = (\eta'^m J_m(\eta')) = \int_0^{\eta'} \eta'^m J_{m-1}(\eta') d\eta'$$

Sendo $m = 1$:

$$(\eta J_1(\eta)) = \int_0^{\eta'} x J_0(x) dx \quad (\text{C.5})$$

Aplicando C.5 em C.3, tem-se:

$$\mathbf{E}_p = \frac{\epsilon_A e^{i(\omega t - kR)}}{R} \frac{2\pi a^2 R}{kaq} J_1(kaq/R) \quad (\text{C.6})$$

A intensidade em um ponto P é dada por $\langle (Re\mathbf{E}_p)^2 \rangle$ e pode ser escrita como:

$$I = I(0) \left(\frac{2J_1(kaq/R)}{kaq/R} \right)^2 \quad (\text{C.7})$$

Em que $I(0) = (\epsilon_A A)^2 / 2R^2$ é a intensidade para o ponto $q = 0$, ou seja, no centro do padrão de difração, como mostra a figura 35. Este padrão de intensidade está ilustrado na figura 36.

Observa-se que o disco central é envolto por um disco escuro, o qual corresponde ao primeiro zero da função de Bessel. Segundo valores tabelados [14], este primeiro zero ocorre quando $J_1(kaq/R) = 0$ e $kaq/R = 2\pi a/\lambda R \approx 4$, de modo que:

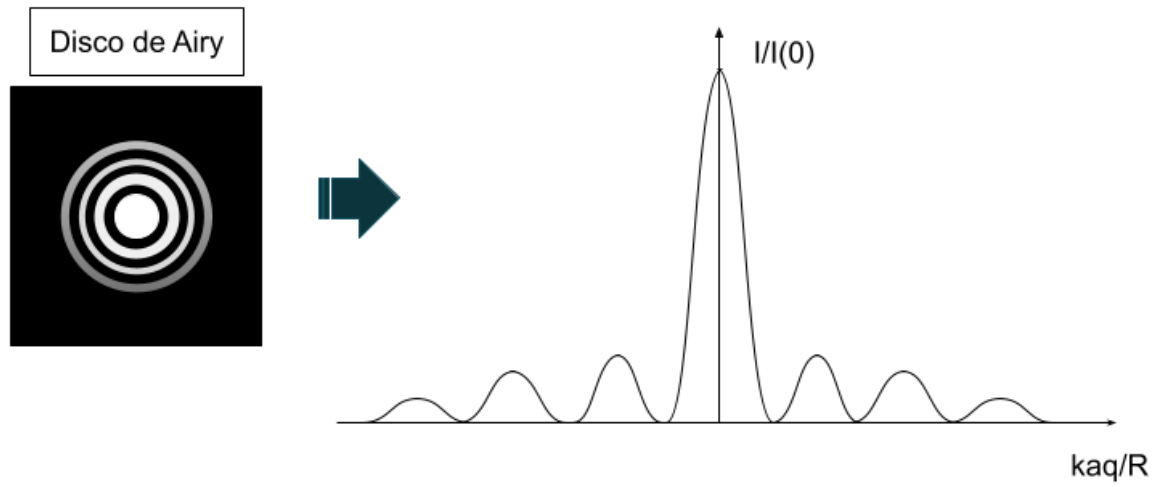


Figura 36 – Representação da curva de intensidade e seu respectivo disco de Airy.

$$q_1 = \frac{4R\lambda}{2\pi a} \quad (\text{C.8})$$

No caso em que há uma lente convergente, de distância focal f , focalizando o feixe no plano σ , $R \approx f$. Sendo $2a = D$ o diâmetro da abertura, tem-se:

$$q_1 = \frac{4f\lambda}{\pi D} \quad (\text{C.9})$$

No caso experimental, D corresponde ao diâmetro do feixe colimado após a passagem pelo filtro espacial e f é o foco da lente responsável pela focalização do feixe no BFP da objetiva.