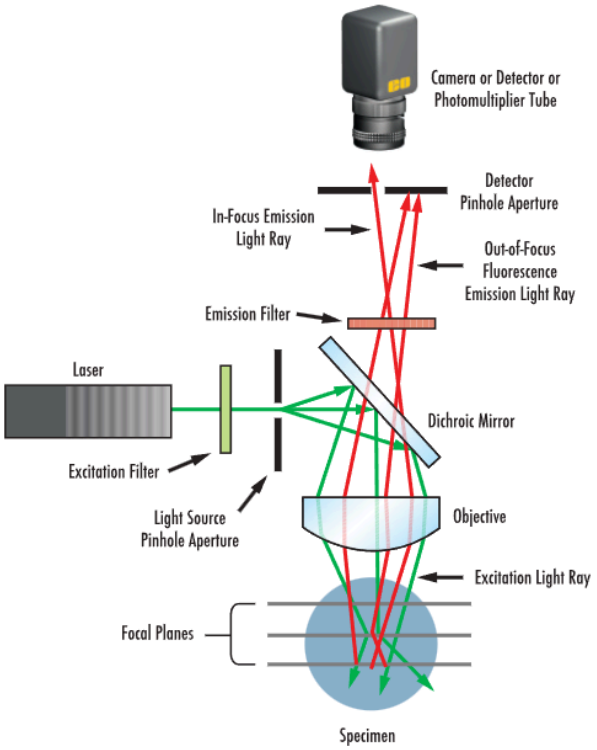
Varredura Confocal

O sistema de varredura, também conhecido como “scan-head” ou “scanner”, faz a varredura do feixe da amostra e também coleta o sinal para a imagem do sinal coletado pela objetiva. O “pinhole” é um dos principais componentes do scan head, que atua como um filtro espacial conjugado com o plano focal da objetiva posicionado diretamente em frente às fotomultiplicadoras.

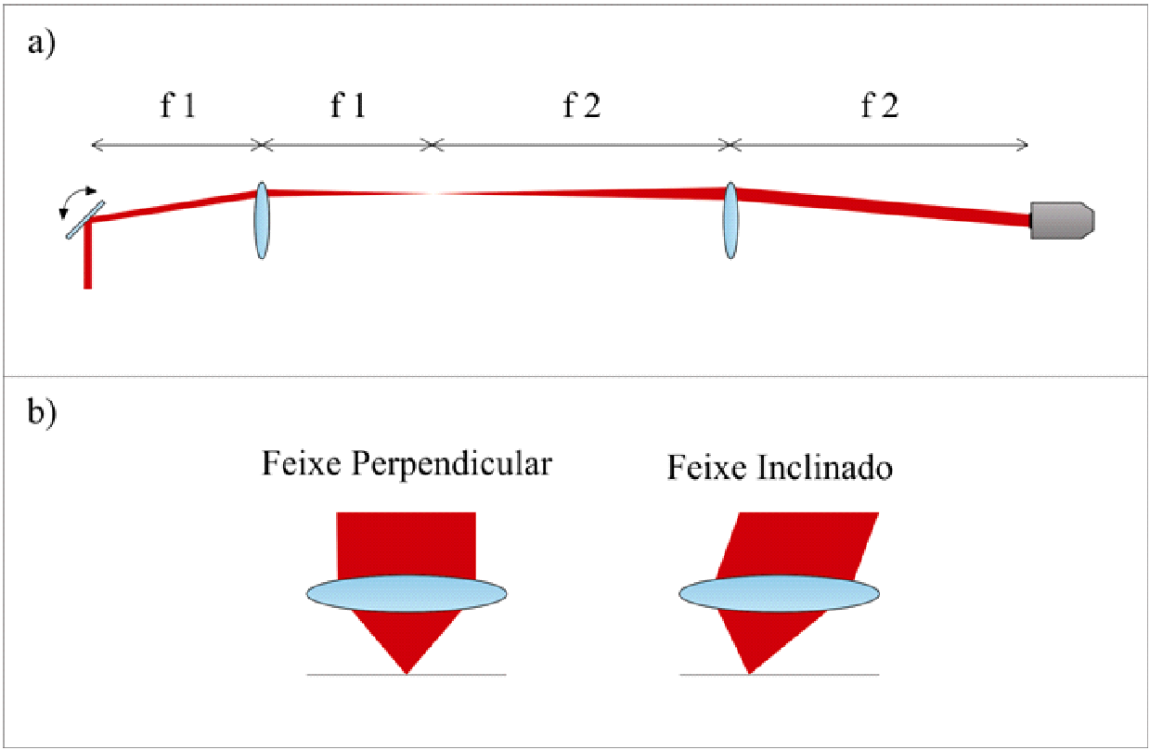


As imagens são adquiridas em 2D fazendo uma varredura no plano focal. As varreduras em X e Y são feitas por dois espelhos independentes. Quando o espelho responsável pela direção X termina de varrer uma linha, ele volta à posição inicial enquanto o espelho responsável pela varredura em Y muda para uma nova posição. A fluorescência que é gerada em cada ponto é coletada pela objetiva retornando pelo mesmo caminho, passando pelos

espelhos de varredura no sentido inverso, esse processo é conhecido como “descanning” do sinal. Após os espelhos de varredura a fluorescência passa direto pelo espelho dicróico e é focalizado no pinhole.

Enquanto o laser varre a amostra, o sinal de cada ponto é detectado pelo detector, que está conectada ao computador. Esse sinal é convertido em uma imagem digital onde cada pixel representa um ponto varrido na amostra. A intensidade do pixel será proporcional a intensidade do sinal detectado. A reconstrução de imagem 3D é feita sobrepondo as imagens em 2D para diferentes planos focais no eixo Z.

Para que o sistema de varredura funcione corretamente é adotada uma montagem, que fica interna ao microscópio, composto por duas lentes que formam um telescópio. Esse telescópio tem como objetivo fazer com que o feixe do laser entre inclinado na objetiva sem diminuir a intensidade e seu funcionamento é descrito na figura abaixo.



Os espelhos galvanômetros são colocados no foco da lente de entrada, essa lente está com o foco no mesmo local do foco de uma segunda lente que direciona o feixe para a entrada da

objetiva, assim o sistema de varredura inclina o feixe na objetiva (a), um feixe entrando inclinado na objetiva irá focalizar no mesmo plano de um feixe perpendicular tento um deslocamento proporcional a inclinação (b).

Referências

https://www.edmundoptics.com/knowledge-center/application-notes/microscopy/confocal-microscopy/

PELEGATI, Vitor Bianchin. Microscopias de óptica não linear: fluorescência excitada por absorção de dois fótons, geração de segundo harmônico e geração de terceiro harmônico. 2010. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física Gleb Wataghin, Campinas, SP.