

ANDRÉ REZENDE DE FIGUEIREDO OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MICROSCÓPIO
CONFOCAL DE VARREDURA LASER PARA
CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DE
SUPERFÍCIES.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

2012

ANDRÉ REZENDE DE FIGUEIREDO OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MICROSCÓPIO CONFOCAL DE
VARREDURA LASER PARA CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DE
SUPERFÍCIES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA MECÂNICA.

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Biasoli de Mello

Co-Orientador: Prof. Dr. Adamo Ferreira Gomes do Monte

UBERLÂNDIA – MG

2012

ANDRÉ REZENDE DE FIGUEIREDO OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MICROSCÓPIO CONFOCAL DE
VARREDURA LASER PARA CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DE
SUPERFÍCIES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA MECÂNICA.

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Daniel Biasoli de Mello - PPGEM – UFU - (Orientador)

Prof. Dr. Adamo Ferreira Gomes do Monte - INFIS – UFU – (Co-orientador)

Profa. Dra. Geralda Cristina Durães de Godoy - DEMET – UFMG

Profa. Dra. Henara Lillian Costa Murray - FEMEC – UFU

UBERLÂNDIA, 23 DE ABRIL DE 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU , MG, Brasil

O48d
2012 Oliveira, André Rezende de Figueiredo, 1978-
Desenvolvimento de um microscópio confocal de varredura laser para
caracterização topográfica de superfícies / André Rezende de Figueiredo
Oliveira. - 2012.

69 f. : il.

Orientador: José Daniel Biasoli de Mello.

Co-orientador: Adamo Ferreira Gomes do Monte.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia mecânica - Teses. 2. Microscopia confocal - Teses. 3.
Tribologia - Teses. I. Mello, José Daniel Biasoli de. II. Monte, Adamo
Ferreira Gomes do. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Mecânica. IV. Título.

CDU: 621

Por que educar?

“A principal meta da educação é criar homens que sejam capazes de fazer coisas novas, não simplesmente repetir o que outras gerações já fizeram. Homens que sejam criadores, inventores, descobridores. A segunda meta da educação é formar mentes que estejam em condições de criticar, verificar e não aceitar tudo que a elas se propõe.”

Jean William Fritz Piaget (1896 – 1980)

Dedico este trabalho à minha esposa **Aline** e aos meus filhos **Anna Luiza** e **André Filho**, minhas fontes de motivação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Professores **Dr. José Daniel Biasoli de Mello** e **Dr. Adamo Ferreira Gomes do Monte**, pela orientação neste trabalho.

A toda a equipe do **Laboratório de Tribologia e Materiais – LTM/FEMEC/UFU** e ao **Laboratório de Espectroscopia Óptica – LEO/INFIS/UFU**, onde encontrei ótimas estruturas de trabalho.

Aos órgãos de fomento **CAPES**, **CNPq** e **FAPEMIG** pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisa que permitiram a realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia** e a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste.

A todos, o meu muito obrigado.

OLIVEIRA, A. R. F., **Desenvolvimento de um Microscópio Confocal de Varredura Laser para Caracterização Topográfica de Superfícies**. 2012. 69f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia.

Resumo

Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma técnica de caracterização topográfica de superfícies. Desta forma, foi desenvolvido um *Microscópio Óptico Confocal de Varredura Laser*, alcançando resolução submicrométrica. A amostra é varrida por laser e sua imagem é virtualmente montada ponto a ponto pela detecção da intensidade da reflexão da luz na superfície da amostra. A técnica confocal se caracteriza pela utilização de uma abertura circular no caminho óptico, este tem a função de eliminar a luz refletida que esteja fora do plano focal.

Em comparações com outras técnicas de caracterização topográficas de superfícies: Interferometria Laser e Microscopia de Força Atômica, o protótipo desenvolvido mostrou um desempenho satisfatório. Os resultados com relação à resolução óptica são compatíveis com os melhores equipamentos disponíveis no mercado, resolvendo claramente padrões de 0,4 μm entre linhas. A técnica demonstra empregabilidade ilimitada em processos de pesquisa, bem como bons resultados em níveis tanto qualitativos quanto quantitativos.

OLIVEIRA, A. R. F., **Development of a Microscope Confocal Scanning Laser Surface Characterization of Surveying**. 2012. 69f. M. Sc. Dissertation, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Abstract

The objective of this study is to develop a laser scanning confocal microscope, achieving submicron resolution in order to characterize surface topography. The laser scanned images are drawn point-by-point using control software.

Comparing with other techniques of topographical characterization of surfaces: Laser Interferometer and Atomic Force Microscopy, the prototype showed a satisfactory performance. Confocal microscopy makes use of an optical technique that enhances contrast and builds three dimensional images by means of a pinhole. For the construction of a confocal image, a laser beam moves point-by-point and line-by-line on the sample surface. The device developed proved to be an appropriate tool with adequate resolution to assess surfaces. The results are consistent with the best resolutions available, and the technique has potential to be employed in several research projects.

Keywords: Confocal laser microscopy, surface topography, tribology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Demonstração através de um perfil das três componentes presentes em uma topografia de superfície.	3
Figura 1.2 - Perfil de rugosidade e ondulação de acordo com o filtro <i>cut-off</i> utilizado. (MUMMERY, 1992)	4
Figura 1.3 – Rugosímetro de contato. (Fonte: <i>Site</i> Mitutoyo Sul Americana.)	6
Figura 1.4 – Esquemática do funcionamento um IL. (Fonte: Manual UBSOFT, 1990).....	8
Figura 1.5 - Interferômetro Laser Microfocus Expert, fabricante UBM.	9
Figura 1.6 – Esquemática do Microscópio de Força Atômica (AFM). (Fonte: <i>Site</i> nanoScience Instruments).....	10
Figura 1.7 – AFM modelo XE-70, fabricante <i>Park System</i> [®] . (Fonte: Manual XE-70)	10
Figura 1.8 – Esquemática do funcionamento do microscópio de campo amplo.....	11
Figura 1.9 – Exemplo de um microscópio de campo amplo.....	11
Figura 1.10 – Marvin Minsky - U.S. Patent 3,013,467 de 07 de novembro de 1957.	12
Figura 1.11 - Princípio de funcionamento do LSCM. (Fonte: <i>Site</i> da Carl Zeiss Microscopy, Jena).....	13
Figura 2.1 – Representação do processo físico de reflexão da luz. (NEWTON, 2002)	15
Figura 2.2 – Princípio de funcionamento do microscópio simples.....	16
Figura 2.3 – Princípio de funcionamento do microscópio confocal. (MINSKY, 1988)	17
Figura 2.4 – Equipamentos necessários ao funcionamento do microscópio confocal de varredura laser. (Fonte: <i>Site</i> Olympus).....	18
Figura 2.5 – Microscópio confocal de varredura laser desenvolvido.....	18
Figura 2.6 – Estrutura do microscópio confocal desenvolvido.	20
Figura 2.7 – Espectro eletromagnético, em destaque, faixa de espectro visível. (JACKSON, 1999).....	20
Figura 2.8 – Diodo Laser LQC405-85E utilizado na montagem do microscópio confocal. ...	21
Figura 2.9 - Espectro de emissão do diodo laser utilizado na montagem do microscópio confocal.	21
Figura 2.10 – Filtro de intensidade de densidade neutra NE510A, marca ThorLabs, utilizado na.....	22

Figura 2.11 – Espectro de intensidade do feixe laser, indicando potencia do laser com relação ao filtro de intensidade.....	23
Figura 2.12 – Imagens geradas em uma mesma área; (a) utilizando filtro de intensidade e (b) sem o filtro.	24
Figura 2.13 – Esquemática da montagem utilizada para o microscópio de campo amplo.	25
Figura 2.14 – Imagem da tela de cristal líquido demonstrando uma chapa metálica texturizada - detalhe do feixe laser sobre a amostra.....	25
Figura 2.15 – Demonstração da óptica geométrica em uma lente convergente (biconvexa). (NEWTON, 2002)	26
Figura 2.16 – Esquemática da função da abertura circular.	26
Figura 2.17 – Representação do padrão de Airy, padrão de difração contendo um máximo central (ordem zero) cercado por discos concêntricos. (Fonte: Site Zeiss).....	27
Figura 2.18 – Montagem utilizando fibra óptica de 50 μm como abertura circular.....	28
Figura 2.19 – Montagem utilizando uma abertura circular fixado diretamente na entrada do detector.....	28
Figura 2.20 – Abertura utilizada na montagem do microscópio confocal (a). Imagem da abertura por microscópio eletrônico de varredura (b). (Fonte: Site Thorlabs®)	29
Figura 2.21 – Representação do <i>cone de luz</i> formado pelo conjunto lentes da objetiva. (Fonte: Site Olympus).....	29
Figura 2.22 - Dois discos de Airy e suas distribuições de intensidade no limite de resolução óptica. (WILHELM, 2011)	30
Figura 2.23 - Efeito da abertura numérica sobre a formação dos discos de Airy. (Fonte: Site Zeiss).....	31
Figura 2.24 – Transladador piezoelétrico utilizado na montagem, modelo Nano Max302 TS - Thorlabs.....	32
Figura 2.25 – Ilustração do piezo atuador e sistema de ajuste manual. (Fonte: Manual Thorlabs® - Nano Max302 TS.).....	33
Figura 2.26 – Representação do movimento do transladador piezoelétrico.	33
Figura 2.27 – Montagem do espelho seletor de imagem. Funcionamento manual (a) e automatizado (b). Placa controlador modelo R-Control 30, fabricante Rogercom.	34
Figura 2.28 – Distribuição do sinal no divisor de feixe (a). Em destaque os dois divisores de feixe(b).....	35
Figura 2.29 – Fenômeno de difração. (HALLIDAY, 2001).....	35

Figura 2.30 – Espectrômetro Ocean Optics Inc. – USB4000, utilizado para montagem do Microscópio Confocal.	37
Figura 2.31 – Representação esquemática do sistema de varredura laser sobre a superfície da amostra.....	38
Figura 2.32 – Exemplo de níveis de cinza utilizando imagem 16bits, variação do preto ao branco (imagem binária). (GU, 1996)	38
Figura 2.33 – Imagem gerada pelo software LabView® a partir da matriz XY obtida na varredura.	39
Figura 2.34 – Tela principal do <i>software Laser Scanning Confocal Microscope – LabVIEW®</i>	40
Figura 2.35 – Tela do <i>Dark Measurement</i> , sinal em tempo real.....	40
Figura 2.36 – Demonstração da aproximação do sinal ao ponto focal.....	41
Figura 2.37 – Imagem demonstrando a varredura no eixo Z em cinco pontos (X_i , Y_j) da matriz.	41
Figura 2.38 – Demonstração da variação da intensidade de reflexão na amostra pelo o deslocamento no eixo Z.....	42
Figura 2.39 – Algoritmo para se determinar o valor do fundo de escala do eixo Z.	43
Figura 3.1 – Imagens de superfícies primárias geradas pelo microscópio confocal de regiões com texturas diferentes.	46
Figura 3.2 – Imagem gerada pelo interferômetro laser (a) e demonstração de todos os perfis ao longo do microsulco (b).	47
Figura 3.3 – Imagem obtida com microscópio confocal e gerada pelo LabVIEW®.....	48
Figura 3.4 – Resultado da imagem gerada pelo microscópio confocal, com valores de fundo de escala para os três eixos.....	48
Figura 3.5 – Imagens da superfície de um disco rígido geradas por microscopia confocal (a) e interferometria laser (b).	49
Figura 3.6 – Imagem da rede de difração gerada pelo microscópio confocal.	50
Figura 3.7 – Imagem das amostras padrão construída pelo microscópio simples montado na estrutura do microscópio confocal.....	50
Figura 3.8 – Imagem gerada pelo AFM e visualizada através do software da <i>Park Systems</i>	51
Figura 3.9 – Superfície primária gerada AFM e pelo <i>software Mountains Map</i>	51
Figura 3.10 – Imagem resultante da aplicação do filtro polinomial.....	52
Figura 3.11 – Resultados da aplicação de filtro de gaussiano de <i>cut-off</i> igual à 800nm.....	53

Figura 3.12 – Imagem da amostra padrão contendo bolsos gerada pelo microscópio confocal (a) e convertida para <i>software Mountains Map</i> (b).....	54
Figura 3.13 – Imagens da amostra padrão contendo bolsos. AFM (a), IL (b) e MCVL (c)....	55
Figura 3.14 – Comparação por vista superior e perfil entre as três técnicas, amostra padrão bolsos em cortes de 10 μm . AFM (a), IL (b) e MCVL (c).....	56
Figura 3.15 – Comparação entre as três técnicas pelo parâmetro topográfico de amplitude S_q para a amostra contendo bolsos.....	57
Figura 3.16 – Comparação entre as três técnicas pelo parâmetro topográfico híbrido (S_{dq}).	58
Figura 3.17 – Comparação entre as três técnicas pelo parâmetro funcional S_{bi}	59
Figura 3.18 – Imagem da amostra padrão trilhas gerada pelo microscópio confocal (a) e convertida para pelo <i>software Mountains Map</i> (b).....	59
Figura 3.19 – Imagens da amostra padrão contendo trilhas geradas pelas três técnicas. AFM (a), IL (b) e MCVL (c).....	60
Figura 3.20 – Comparação por vista superior e perfil das três técnicas. AFM (a), IL (b) e MCVL (c).....	61
Figura 3.21 – Comparação entre as três técnicas pelos parâmetros topográficos de amplitude.....	62
Figura 3.22 – Comparação entre as três técnicas pelos parâmetros topográficos de Híbrido.	63
Figura 3.23 – Parâmetro funcional S_{bi} para a amostra contendo trilhas.....	63
Figura 4.1 – Posicionador Z825B – <i>Serie Motorized DC Servo Actuator</i> adquiridos e <i>apt – dc serve controller USB</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Comparação entre as técnicas de Microscopia Confocal, Interferometria Laser e Microscopia de Força Atômica.	14
Tabela 2.1 – Características do diodo laser utilizado na montagem do microscópio confocal.	22
Tabela 2.2 – Características do <i>piezo</i> posicionador <i>Nano Max302 TS</i> . (Fonte: Site <i>Thorlabs</i>)	33
Tabela 2.3 – Característica do espectrômetro marca Ocean Optic, modelo UBSB4000, utilizado na montagem do Microscópio Confocal. (Fonte: Manual Ocean Optics UBS4000)	37
Tabela 3.1 – Determinação do valor do fundo escala para o eixo vertical para a amostra contendo bolsos. (Valores de intensidade na forma de potência 10^4).....	54
Tabela 3.2 – Resultados dos parâmetros topográficos para amostra padrão contendo Bolsos. Comparação entre AFM, Interferometria e Confocal.	57
Tabela 3.3 – Resultados dos parâmetros topográficos para amostra padrão contendo trilhas. Comparação entre AFM, Interferometria e Confocal.....	61
Tabela AI.1 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos S_q para amostra padrão contendo bolsos. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal.....	70
Tabela AI.2 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos S_{dq} para amostra padrão contendo bolsos. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal.....	70
Tabela AI.3 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos S_{bi} para amostra padrão contendo bolsos. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal.....	71
Tabela AI.4 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos S_q para amostra padrão contendo trilhas. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal.....	71
Tabela AI.5 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos S_{dq} para amostra padrão contendo trilhas. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal.....	71
Tabela AI.6 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos S_{bi} para amostra padrão contendo trilhas. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal.....	71

LISTA DE SÍMBOLOS

% = Porcentagem;

ΔI = Variação de intensidade entre ponto mais alto e mais baixo da superfície;

Δx = Variação na direção do eixo x;

Δy = Variação na direção do eixo y;

ΔZ = Variação total na direção do eixo Z;

μm^2 = Micrometro quadrados;

2D = Duas dimensões;

3D = Três dimensões;

AB = Raio de luz incidente;

ABNT = Associação Brasileira de Normas Técnicas;

ANOVA = Análise de Variância;

AFM = *do inglês: Atomic Force Microscopy*;

AN = Abertura numérica;

atm = Unidade de pressão;

BC = Raio de luz refletido;

BMP = Bitmap (Formato de arquivo de imagem);

c = Velocidade da luz no vácuo;

CBC = Comitê Brasileiro de Certificação

CCD = *do inglês: Charge-Coupled Device*;

cut-off = Valor de corte do comprimento de onda de corte de uma superfície;

Dark = Menor valor registrado pelo detector;

d_i = Diferença em módulo entre I_MAX e I_MIN;

d_Z = Diferença em módulo entre I_MAX e DARK;

d_z = Deslocamento real do eixo Z em micrometros;

End Position = Posição final da varredura;

g = gramas

GaN = Nitreto de Gálio;

gl = graus de liberdade;

GPS = *do inglês*: Geometrical Product Specifications;

i = ângulo de incidência, formado entre o raio incidente e a reta normal;

I_Max = Valor da intensidade no ponto mais alto da superfície;

I_Min = Valor da intensidade no ponto mais baixo da superfície;

I_Max_M = Valor máximo da matriz, equivalente ao valor do I_MAX;

I_Min_M = Valor mínimo da matriz, equivalente ao valor do DARK;

IL = Interferometro Laser;

in vivo = *do Latim*: dentro de vivo; *em ciência*: experiência realizada em um organismo vivo;

INMETRO = Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial;

ISO = *do inglês*: International Standard Organization

k = Constante de correção experimental;

Kg = Quilograma;

LASER = *do inglês*: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation;

LR = Limite de Resolução

LSCM = *do inglês*: Laser Scanning Confocal Microscope

M = Número de linhas da matriz;

mA = Miliampére;

Mbps = Mega bites por segundo;

MCVL = Microscópio Confocal de Varredura Laser;

MEV = Microscópio Eletrônico de Varredura;

mm = Milímetro

mm² = Milímetro quadrado;

mrad = miliradianos;

ms = milisegundos;

mW = miliwatt;

N = Número de colunas da matriz;

N^* = Reta normal à superfície;

n = Índice de Refração

nm = Nanometro;

θ_1 = Ângulo de incidência do feixe sobre a superfície;

θ_2 = Ângulo de reflexão do feixe na superfície;

$^{\circ}\text{C}$ = Graus Celsius;

PZT = Piezoelétrico

r = ângulo de reflexão, formado entre o raio refletido e a reta normal

Ra = Média aritmética do perfil de rugosidade;

Raio 1 = o raio incidente da figura 12;

Raio 2 = o raio refratado, da figura 12;

RMS = *do inglês*: Root Mean Square;

s = Unidade de Tempo - Segundo(s);

Sa = Média aritmética da rugosidade tridimensional

Sbi = Parâmetro topográfico funcional que descreve a capacidade de suporte mecânico de uma superfície;

Sdq = Parâmetro topográfico híbrido capaz de informar o valor do desvio quadrático médio para a inclinação da superfície;

Sen = Função trigonométrica Seno;

Si = Silício;

SiO₂ = Dióxido de Silício;

Sq = Desvio médio quadrático da rugosidade superficial;

T = reta tangente à superfície no ponto B;

T-Set = Tempo de integração;

v = Velocidade da Luz no meio material;

VDC = *do inglês*: Voltage Direct Current;

x = Eixo x ;

X = Indica o número de vezes de ampliação;

X-Setp = Valor do passo no eixo X ;

y = Eixo y ;

z = Eixo z ;

Z = Eixo vertical;

$Z(x_i, y_j)$ = Valor do ponto do eixo vertical em um ponto específico (x_i, y_j) ;

Z_{ij} = Valor dos pontos da matriz;

Z-Setp = Valor do passo no eixo vertical;

λ = Comprimento de onda da onda eletromagnética;

λ_c = Comprimento de onda de separação da rugosidade da superfície - cut-off;

μ = Ângulo de formação do *cone de luz* entre objetiva e superfície da amostra;

μm = Micrometro;

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1 - TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICAS.....	6
1.2 – INTERFERÔMETRO LASER.....	7
1.3 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	9
CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO	15
2.1 - MICROSCÓPIO CONFOCAL DE VARREDURA LASER	18
2.1.1 – Base e Estrutura do Microscópio	19
2.1.2 - A Fonte Laser	20
2.1.3 – Filtro de Intensidade.....	22
2.1.4 - Sistema de Iluminação.....	25
2.1.5 – Lente Convergente.....	26
2.1.6 – Abertura Circular.....	26
2.1.7 – Objetiva.....	29
2.1.8 – Resolução do Microscópio Confocal.....	31
2.1.9 – Transladadores	32
2.1.10 – Divisor de Feixe	34
2.1.11 - Aquisição de Sinal	36
2.2 - MONTAGEM DA IMAGEM VIRTUAL DA SUPERFÍCIE DA AMOSTRA.....	38
2.2.1 – SOFTWARE LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPE – LABVIEW	39
2.2.2 – DETERMINAÇÃO DO FUNDO DE ESCALA DO EIXO VERTICAL.....	41
2.3 - CALCULO DE PARÂMETROS TOPOGRÁFICOS DE SUPERFÍCIE.....	44
2.4 - CONFIGURAÇÕES UTILIZADAS NAS TÉCNICAS EXPERIMENTAIS.....	44
CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
CAPÍTULO IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
4.1 – TRABALHOS FUTUROS	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO I	70

INTRODUÇÃO

A técnica de microscopia confocal de varredura laser se tornou uma ferramenta essencial em ciências de materiais devido a atributos não disponíveis em microscopia óptica tradicional, em particular, o modo de contraste.

O conceito básico de microscopia confocal foi desenvolvido originalmente por Marvin Minsky nos anos 50 durante o seu pós-doutorado na Universidade de Harvard. Minsky tentava observar células neurais *in vivo* (MINSKY, 1988). A invenção de Minsky permaneceu décadas sem aplicação, provavelmente pela falta de fontes intensas de luz, detectores eficientes e computadores com capacidade de processar grande quantidade de dados.

Após o trabalho de Minsky, David Egger e Mojmir Petran (1967) construíram, nos anos de 1960, um microscópio confocal para examinar seções de células cerebrais. Este utilizava um disco giratório contendo várias aberturas circulares (disco de *Nipkow*). Em 1973, Egger desenvolveu o primeiro microscópio confocal laser e publicou as primeiras imagens reconhecíveis de células. No fim da década de 1970, o físico holandês G. J. Brakenhoff e colaboradores (1979) desenvolveram o primeiro microscópio confocal com sistema de varredura. Simultaneamente, Colin Sheppard contribuiu para a técnica com a teoria de formações de imagens. Durante os anos 1980, os avanços dos computadores, da tecnologia dos lasers e dos novos algoritmos de manipulação digital de imagens promoveram o interesse em microscopia confocal. Brad Amos e John White demonstraram a utilidade de imagens construídas por microscópio confocal em exame de espécimes biológicos fluorescentes. (AMOS et al., 2003).

Segundo Hanlon e colaboradores (2001) os primeiros instrumentos comerciais apareceram em 1987 e evoluíram durante os anos 1990, com avanços dos componentes ópticos, da eletrônica, das fontes lasers e dos detectores. A redução dos custos de produção, o aumento da velocidade de processamento e a evolução da capacidade de armazenamento de dados dos microcomputadores também contribuíram a expansão do número de aplicações da microscopia confocal. Atualmente estes microscópios são empregados em pesquisas em diversas áreas da ciência dos materiais: semicondutores, metais, polímeros, entre outros.

A microscopia confocal oferece várias vantagens com relação aos microscópios de campo amplo convencionais. Ela possui a capacidade de controlar profundidade de campo,

reduzindo a informação periférica ao plano focal, aumentando o contraste e conseqüentemente à qualidade da imagem. O microscópio confocal possibilita uma maior resolução em ambos os componentes axiais (lateral e vertical), desta forma, a tecnologia confocal prova ser um dos avanços mais importantes alcançados em microscopia óptica nos últimos anos. (OLIVEIRA, et al. 2010)

Os objetivos deste trabalho consistem no desenvolvimento de um *Microscópio Confocal de Varredura Laser* e caracterização da topografia de superfície de amostras inorgânicas, realizando comparações qualitativas e quantitativas com outras técnicas topográficas: *Interferômetro Laser* e *Microscópio de Força Atômica*.

A utilização da técnica confocal com a finalidade de caracterizar uma superfície inorgânica é motivador, uma vez que em sua grande maioria a microscopia confocal é empregada na construção de imagens de materiais orgânicos, principalmente biomateriais. Além de aplicar esta técnica óptica em investigações e análise de superfícies de engenharia (metais, polímeros, cerâmicos) a construção do equipamento é por si motivador, pois trata de um desenvolvimento com aplicabilidade direta onde os resultados possuem uma infinidade de áreas em potencial dentro do universo relacionado à superfície de materiais de engenharia. Outra motivação deste trabalho está relacionada ao baixo custo do equipamento desenvolvido com relação aos microscópios confocais existentes no mercado. O projeto foi concluído com um custo total de vinte e cinco mil reais.

No primeiro capítulo desta dissertação é apresentada uma revisão bibliográfica sobre o assunto, a qual aborda as técnicas utilizadas neste processo de comparação, definições sobre a rugosidade e seus parâmetros, normas técnicas para determinação da topografia de superfícies e também sobre o surgimento da técnica de microscopia confocal laser.

O segundo capítulo apresenta os materiais e métodos utilizados nos procedimentos experimentais, na montagem do microscópio confocal de varredura laser. No terceiro capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos através do procedimento experimental. O quarto capítulo apresenta as conclusões, tomadas com base na discussão realizada através dos resultados obtidos e também sugestões para trabalhos futuros. Por fim são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas para a realização desta dissertação.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sabe-se que a topografia de superfície influencia não somente as propriedades físico-químicas e mecânicas de partes em contato bem como de alguns componentes sem contato. A amplitude e as características espaciais de topografia de superfície dominam as aplicações funcionais em um universo tribológico. Além disso, o desempenho e a confiabilidade de componentes de engenharia podem ser aumentados selecionando-se características topográficas apropriadas. (Dong et al., 1994)

Cada superfície é composta de três diferentes componentes: forma, ondulação e rugosidade, como demonstrada na Figura 1.1. A separação destes componentes é realizada através da aplicação de filtros matemáticos, separando a forma do perfil primário e a partir desta separa-se a ondulação da rugosidade.

A forma e a ondulação possuem características macrogeométricas, ondas de comprimento bem maior que sua amplitude e baixa frequência. A rugosidade possui alta frequência e comprimentos de ondas semelhantes à amplitude.

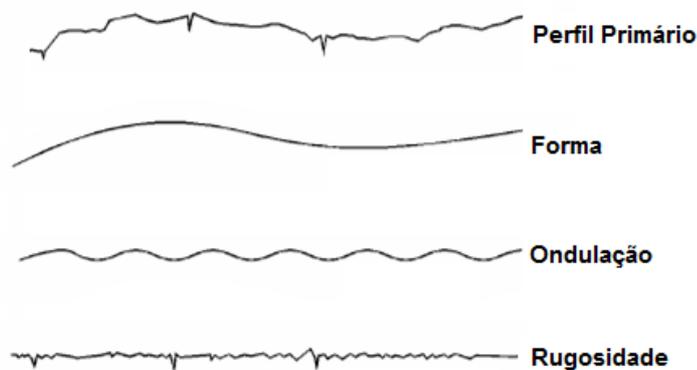


Figura 1.1 – Demonstração através de um perfil das três componentes presentes em uma topografia de superfície.

O ponto no qual a componente ondulação se separa da componente rugosidade em uma superfície é chamado de *cut-off* (λ_c). A Figura 1.2 demonstra que o valor selecionado para o *cut-off* influencia fortemente o resultado final da análise de uma superfície. (MUMMERY, 1992)

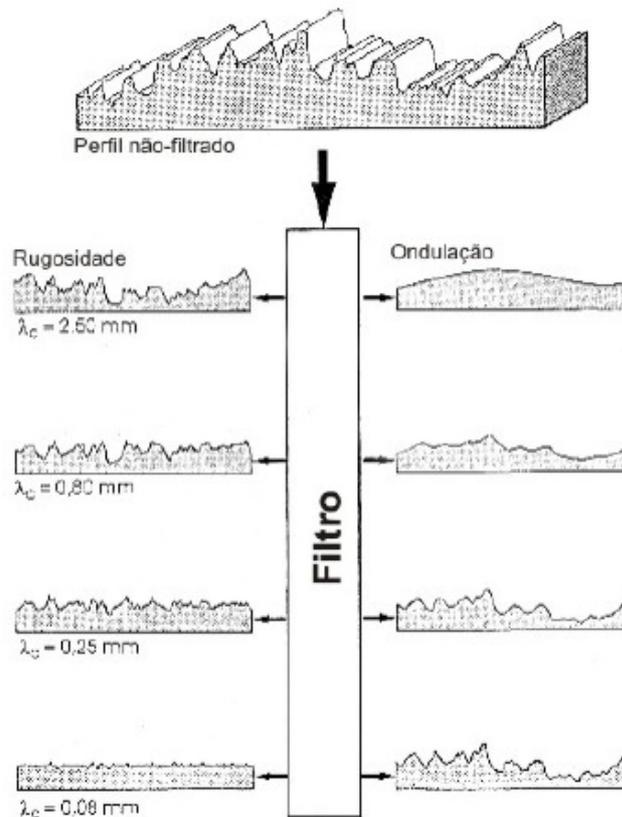


Figura 1.2 - Perfil de rugosidade e ondulação de acordo com o filtro *cut-off* utilizado. (MUMMERY, 1992)

Os parâmetros topográficos possuem a capacidade de descrever uma superfície através de valores numéricos. Estes são calculados utilizando fórmulas e filtros matemáticos e estatísticos, preestabelecidas em normas técnicas. Uma vez que estes parâmetros tentam reduzir todas as informações contidas em uma superfície para um único número, muito cuidado deve ser tomado na aplicação e ao interpretá-las.

Por convenção, todos os parâmetros de rugosidade bidimensionais (2D) são representados pela letra *R* seguido por caracteres adicionais ao índice, enquanto que para os parâmetros tridimensionais usa-se o prefixo *S*. O índice identifica o parâmetro, por exemplo: *Ra* é a média aritmética do perfil de rugosidade e *Sa* é a média aritmética da rugosidade tridimensional (3D). Uma grande quantidade de parâmetros de topografia de superfície está disponível para os analisadores. Para duas superfícies com diferentes características de rugosidade, os resultados para cada uma delas devem indicar valores

diferentes. Casos estes valores não apresentem diferença, a medição está sem sentido e outro parâmetro deve ser selecionado para comparações. Portanto, ao se escolher os parâmetros, deve-se levar em conta a sua sensibilidade em medir e representar as características da superfície.

Para se realizar as análises quantitativas, neste trabalho, foram utilizados parâmetros topográficos que permitem a caracterização quanto a: amplitude, amplitude em função de área (híbrido) e funcionabilidade da superfície. A análise por estas três classes de parâmetros topográficos possui a capacidade de caracterizar completamente uma topografia de superfície. Desta forma utilizou-se o parâmetro de amplitude Sq (Desvio quadrático médio), o parâmetro híbrido Sdq , que relaciona a inclinação média das irregularidades e o parâmetro funcional Sbi que descreve a capacidade de suporte mecânico da superfície. Os parâmetros topográficos utilizados neste trabalho basearam-se em normas para parâmetros da rugosidade de perfis, Norma Técnica ISO 11562 de 1997 e ISO 4287 de 1998.

O parâmetro topográfico de amplitude Sq descreve basicamente a variância da topografia superficial, em relação a um plano médio. E pode ser determinado pela Eq. (1.1).

$$Sq = \sqrt{\frac{1}{M \cdot N} \sum_{k=1}^M \sum_{j=1}^N z_{jk}^2} \quad (1.1)$$

onde: Z_{jk} é o valor dos pontos da matriz e M e N número de colunas e linhas da matriz.

O parâmetro híbrido Sdq informa o desvio quadrático médio para a inclinação da superfície. Este parâmetro relaciona a amplitude com área varrida nas direções dos eixos x e y e pode ser determinado pela Eq. (1.2)

$$Sdq = \sqrt{\frac{1}{(M-1)(N-1)} \sum_{j=2}^N \sum_{i=2}^M \left(\frac{z(x_i, y_j) - z(x_{i-1}, y_{j-1})}{\Delta x} \right)^2 + \left(\frac{z(x_i, y_j) - z(x_{i-1}, y_{j-1})}{\Delta y} \right)^2} \quad (1.2)$$

onde: $Z(x_i, y_j)$ é o valor numérico dos pontos da matriz, M e N número de colunas e linhas da matriz, Δx é variação na direção do eixo x e Δy variação na direção do eixo y .

O parâmetro funcional é de suma importância para se determinar a maioria das interações das superfícies em engenharia. Entendendo que a superfície real compreende uma área tridimensional, conclui-se que a informação necessária para descrever as suas funções deve ser similarmente em três dimensões. O carregamento real de contato entre

duas superfícies é menor que 5% da sua área nominal. O parâmetro funcional S_{bi} , determina o índice de apoio da superfície e é definido como sendo a razão entre os parâmetros do desvio quadrático médio (S_q) e a altura da superfície a 5% da área de mancal, a Eq. (1.3), descreve este parâmetro.

$$S_{bi} = \frac{S_q}{\eta_{0,05}} \quad (1.3)$$

onde: η é um função de densidade de probabilidade da superfície residual.

Um valor alto do S_{bi} indica que a superfície em análise possui boa propriedade de mancal.

1.1 - Técnicas de Caracterização Topográficas

Técnicas de caracterização topográficas são bastante utilizadas na indústria e em pesquisas acadêmicas para controle funcional de superfícies, estas podem ser divididas em dois grupos com relação à representatividade. Pode-se analisar uma superfície através de um perfil bidimensional (2D) que tenha a capacidade de descrever a topografia da superfície analisada ou através de uma representação tridimensional da superfície (3D). A caracterização topográfica de superfícies em três dimensões ganha novos adeptos a cada dia, pois garante uma maior representatividade da superfície analisada do que as técnicas em duas dimensões.

Outra subdivisão relacionada às técnicas de topografia está ligada ao modo de varredura do equipamento. Pode-se realizar uma varredura da amostra por contado, utilizando um apalpador mecânico, como demonstrado pela Figura 1.3 ou varredura sem contato, utilizando feixe de luz.



Figura 1.3 – Rugosímetro de contato. (Fonte: Site Mitutoyo Sul Americana.)

Segundo De Mello e colaboradores (2006), técnicas de medição óptica possuem uma vantagem com relação aos métodos de avaliação de superfícies com apalpadores mecânicos: elas evitam o contato entre mensurando e mensurado e conseqüentemente não caracterizam o ensaio como destrutivo.

A conseqüência deste contato pode acarretar numa alteração da superfície medida, a ponta do apalpador pode *riscar* a superfície da amostra e também sofrer desgaste provocado por este contato, que por sua vez induz erros de medições sistemáticos.

Em técnicas ópticas, as modificações superficiais da amostra pela ação da fonte de luz na varredura ocorrerão eventualmente ao se selecionar fontes inadequadas para a análise de materiais orgânicos, como polímeros. Neste caso, a seleção de uma fonte laser com potência relativamente alta também poderá danificar a superfície da amostra.

As técnicas ópticas de topografia de superfície que utilizam luz monocromática possuem uma capacidade de penetração nas estruturas da topografia relacionada ao comprimento de onda desta fonte de luz. Equipamentos ópticos modernos dispõem de fontes laser com comprimento de onda da ordem de 400 nm.

A resolução dos equipamentos de caracterização topográfica está intimamente relacionada à esta capacidade de penetração da luz ou ao raio de ponta dos apalpadores mecânicos. Equipamentos convencionais de caracterização por contato possuem apalpadores com raio de ponta da ordem de micrometros, porém equipamento como o microscópio de força atômico, denominado como um equipamento *não convencional* de caracterização topográfica por contato possui apalpadores com raio de ponta da ordem de nanometros. (Site: *nanoScience Instruments*)

1.2 – Interferômetro Laser

O Interferômetro Laser (IL) trata-se de um equipamento de caracterização de topografia de superfície por medição óptica, o seu princípio de funcionamento baseia-se na varredura do feixe laser sobre a amostra, onde o foco é continuamente ajustado de acordo com a superfície varrida. O cálculo para se determinar a variação no eixo Z é realizado pela comparação entre as fases da onda eletromagnética do feixe de luz incidente e do refletido na superfície da amostra.

Pela Figura 1.4 observa-se o funcionamento do interferômetro laser. A partir de um diodo laser (1) realiza-se a varredura da amostra, este feixe passa por um prisma (2) que possui a função de refletir parte do sinal para um foto diodo (5) e outra parte do sinal para um divisor de feixe (3) que direciona o feixe para a amostra (13). Neste caminho óptico

existe uma controladora PZT (6) com a função de ajustar o foco sobre a amostra, uma lente convergente (9), dois colimadores do feixe óptico (7 e 8), um tubo óptico (11) e uma objetiva (10), este conjunto óptico possui a função de colimar e focalizar opticamente o feixe sobre a amostra.

A luz refletida proveniente da amostra retorna pelo mesmo caminho óptico ao fotodiodo que registra a diferença de fase entre o feixe original e o refletido. Através deste sinal constrói-se virtualmente a topografia da superfície varrida. Para varredura, uma mesa com resolução submicrométrica tem a função de deslocar a amostra.

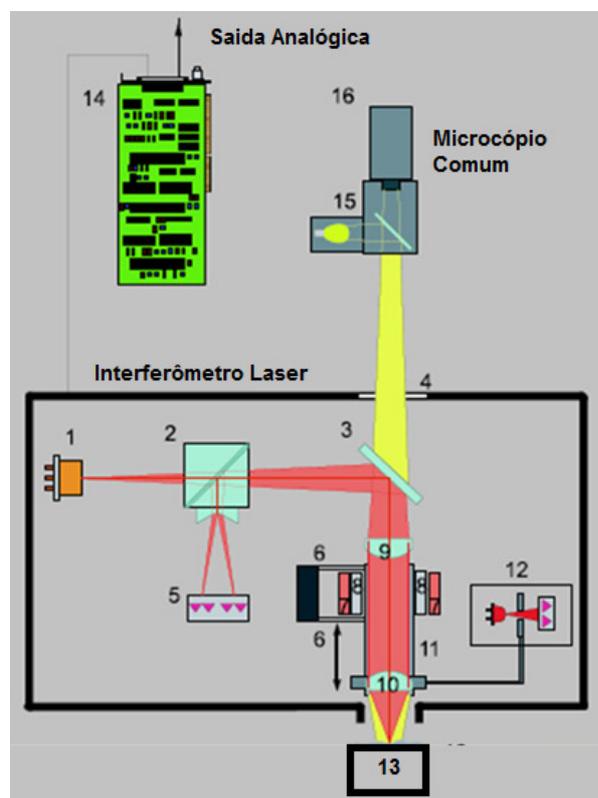


Figura 1.4 – Esquematização do funcionamento um IL. (Fonte: Manual UBSOft, 1990)

A interface com o usuário para este IL é realizada através de um sistema de medição (12) que indica a aproximação do feixe laser do seu ponto focal ao se deslocar a amostra verticalmente. A placa controladora (14) realiza a função de conversor de sinal que será tratado por um processador. Para se visualizar a amostra antes do processo de varredura existe um microscópio comum, este é constituído por uma fonte de iluminação (15), uma janela óptica e uma câmera digital. (16)

Neste trabalho foi utilizado o Interferômetro Laser Microfocus Expert IV do fabricante UBM. (Figura 1.5). Este equipamento possui resolução lateral de $0,1 \mu\text{m}$, resolução vertical de 60 nm .

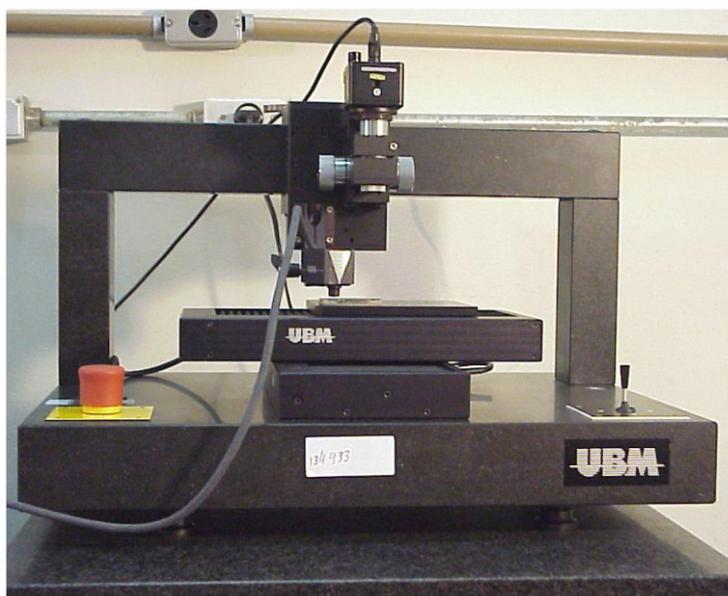


Figura 1.5 - Interferômetro Laser Microfocus Expert, fabricante UBM.

1.3 - Microscopia de Força Atômica

A Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês) trata-se de outra técnica de caracterização de superfície por varredura. Esta técnica utiliza uma sonda de varredura de altíssima resolução vertical, da ordem de frações de um nanometro. O microscópio de força atômica é uma das ferramentas mais importante para geração de imagens e manipulação da matéria em escala nanométrica.

As informações são obtidas pela varredura de um *cantilever*, este possui uma sonda em sua extremidade constituída tipicamente de silício ou nitreto de silício. A sonda possui uma ponta de raio de curvatura da ordem de 10 nanometros. Quando esta é colocada próximo à superfície da amostra, forças entre a ponta e a amostra levam a um desvio do *cantilever*.

Um AFM possibilita a medição de força de contato mecânico, forças de *Van der Waals*, forças capilares, força de ligação química, forças eletrostáticas e forças magnéticas.

Para se construir uma imagem pelo AFM utiliza-se o mapeamento das deflexões do *cantilever*, o sinal do feixe laser reflete na parte superior do mesmo e este é captado por uma matriz de fotodiodos. (Figura 1.6)

Neste trabalho foi utilizado o microscópio de força atômica modelo XE-70 de fabricação da Park System[®]. (Figura 1.7)

Em condições ideais, esta técnica permite resolução lateral em nível atômico e resolução vertical da ordem de 1 nm.

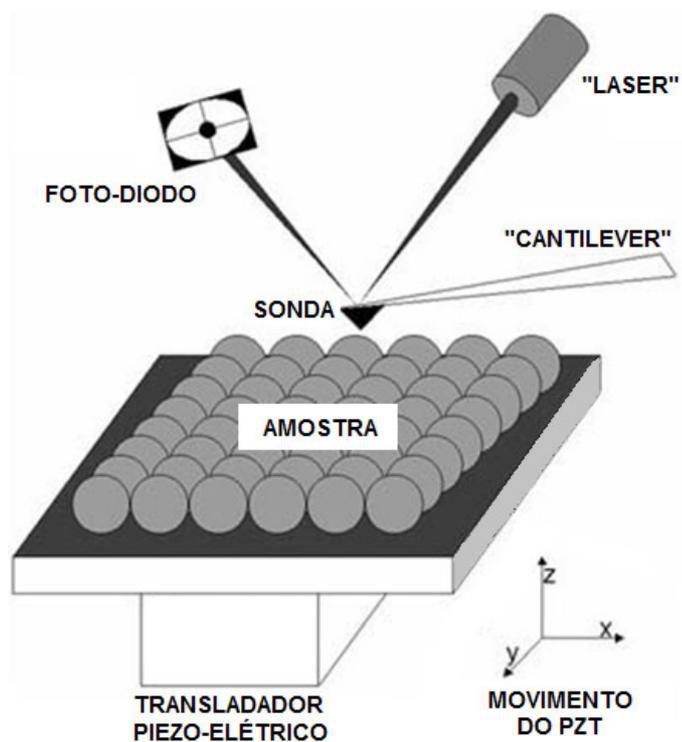


Figura 1.6 – Esquematização do Microscópio de Força Atômica (AFM). (Fonte: Site nanoScience Instruments)



Figura 1.7 – AFM modelo XE-70, fabricante *Park System*®. (Fonte: Manual XE-70)

1.4 - Microscopia Confocal de Varredura Laser

O microscópio confocal nasce do microscópio de campo amplo, este possui origem secular e trabalha com iluminação da amostra em estado saturado, ou seja, neste sistema a iluminação é realizada acima do plano da amostra, deste modo a *luz branca* viaja ao longo do eixo óptico até ser focalizada na amostra pela objetiva. (Figura 1.8)

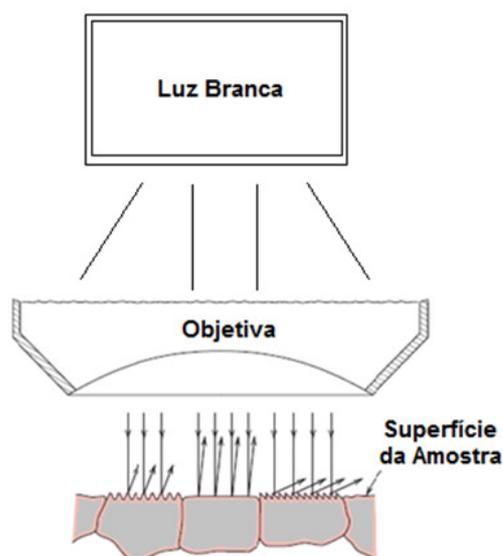


Figura 1.8 – Esquemática do funcionamento do microscópio de campo amplo.

A amostra é visualizada pela luz que nela reflete. A Figura 1.9 demonstra um exemplo de microscópio de campo amplo, esta técnica é bastante utilizada em análises de microestruturas em metalografia.

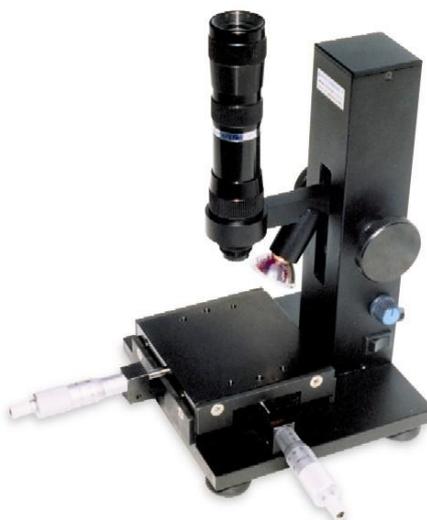


Figura 1.9 – Exemplo de um microscópio de campo amplo.

O conceito de imagem confocal foi patenteado por Marvin Minsky em 1957, sendo a técnica imagiológica desenvolvida por ele em 1955. (Figura 1.10)

Marvin Minsky, enquanto estudante de pós-doutoramento na *Universidade de Harvard*, construiu um microscópio com o objetivo de obter uma imagem de redes de células neurais, utilizando preparações não coradas, ou seja, tecidos não dopados por substâncias fluorescentes.

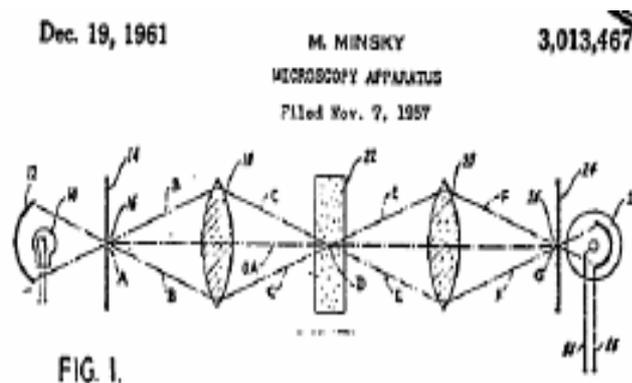


Figura 1.10 – Marvin Minsky - U.S. Patent 3,013,467 de 07 de novembro de 1957. (MINSKY, 1961)

Confocal é definido como *ter o mesmo foco*. O microscópio confocal elimina a informação *fora do foco* por meio de uma abertura circular (*pinhole*) situada em frente ao plano da imagem, este age como um filtro espacial e permite a passagem apenas da parte de luz proveniente do plano focal.

Apesar do funcionamento do microscópio confocal ser semelhante ao do microscópio de campo amplo, a microscopia confocal possibilita aumentar o contraste da imagem, permite também construção de imagens tridimensionais e proporciona grande definição da mesma. A técnica de microscopia confocal utiliza uma combinação de recursos de microscopia óptica aliada a princípios de computação, aquisição de sinal e processamento de dados. Existem três tipos de *Microscópios Confocais* comercialmente disponíveis:

- O *Laser Scanning Confocal Microscope* (LSCM), é o modelo mais utilizado devido à elevada qualidade de imagem que permite a obtenção de imagens de alta resolução através de cortes ópticos, posteriormente agrupados para se fazer a reconstrução tridimensional da topografia de objetos complexos;
- *Spinning-Disk Confocal Microscope*, utiliza um disco de *Nipkow* (disco rotativo com aberturas circulares dispostas numa espiral em torno da sua borda, onde a luz que passa através dos orifícios produz um padrão de digitalização (EGNER et al., 2001). A velocidade de construção de imagens é maior que o LSCM, sendo, por isso, útil em observações dinâmicas;

- *Programmable Array Microscope (PAM)*, neste, o sistema óptico utiliza microscopia de fluorescência, o campo é todo iluminado, enquanto o Microscópio Confocal focaliza somente um ponto em determinada profundidade na amostra.

O sistema de microscopia confocal desenvolvido neste trabalho trata-se de um LSCM. A Figura 1.11 mostra o funcionamento deste microscópio, que utiliza um feixe laser para varrer a amostra. Transladando o ponto focal, produzido pela objetiva, mantendo a profundidade de foco é possível iluminar toda a superfície em estudo, ponto a ponto. A luz refletida na amostra retorna pelo mesmo caminho óptico até passar pela abertura circular. A luz proveniente do plano focal da imagem é detectada e os sinais gerados são processados com a finalidade de se construir uma imagem virtual da superfície varrida pelo laser.

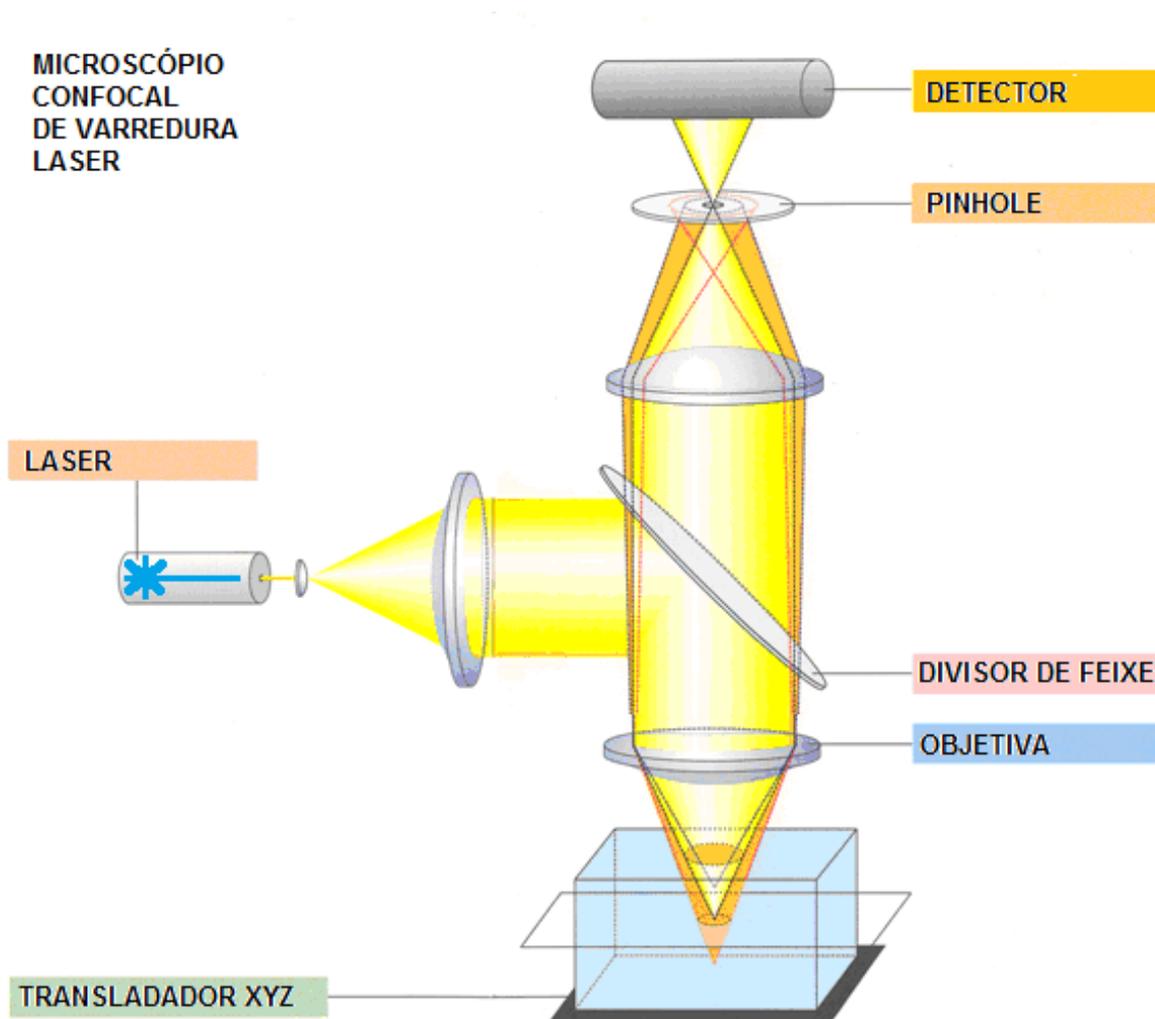


Figura 1.11 - Princípio de funcionamento do LSCM. (Fonte: Site da Carl Zeiss Microscopy, Jena)

Esta técnica vem adquirindo grande popularidade, pois comporta uma gama infinita em aplicações científicas. O microscopia confocal de varredura laser mostra-se adequada em análise de superfícies de materiais metálicos, poliméricos, biológicos, cerâmicos e semicondutores.

Os objetivos deste trabalho consistem em desenvolver um microscópio confocal de varredura laser e caracterizar a topografia de superfície de amostras realizando comparações entre os resultados obtidos em outros equipamentos, como: Interferômetro Laser e Microscópio de Força Atômica.

A Tabela 1.1 demonstra uma breve comparação entre as três técnicas utilizadas neste trabalho, os números apresentados são valores referentes às melhores configurações disponíveis no mercado.

Tabela 1.1 - Comparação entre as técnicas de Microscopia Confocal, Interferometria Laser e Microscopia de Força Atômica.

TÉCNICAS	INTERAÇÃO	RESOLUÇÃO	VELOCIDADE	ÁREA
	DIRETA*	LATERAL	VARREDURA	VARRIDA
CONFOCAL**	NÃO	200 nm	2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	10 ³ mm ²
INTERFERÔMETRIA	NÃO	200 nm	2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	10 ³ mm ²
AFM	SIM	10 nm	0,5 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	10 ⁻² mm ²

* Envolve forças entre mensurando e mensurado.

** Microscópio confocal utilizando motor de modo contínuo como translador.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO

O processo físico da microscopia confocal se apóia no fenômeno de reflexão, que consiste no fato da luz voltar a se propagar no meio de origem após incidir sobre um objeto ou superfície. Os fenômenos onde ocorre reflexão, tanto regular quanto difusa, obedecem a duas leis fundamentais:

1ª lei da reflexão: O raio de luz refletido e o raio de luz incidente, assim como a reta normal à superfície são coplanares.

2ª Lei da reflexão: O ângulo de reflexão (r) é sempre igual ao ângulo de incidência (i). ($i = r$) (Figura 2.1)

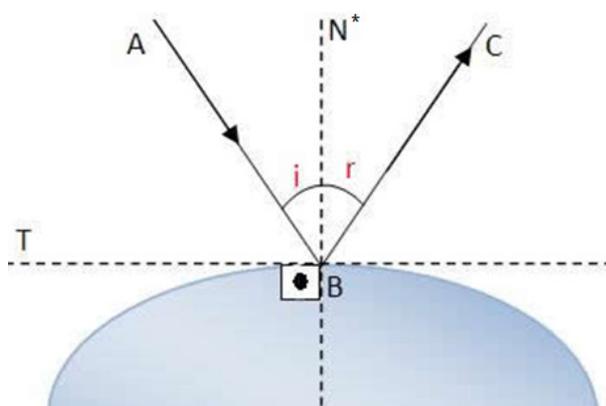


Figura 2.1 – Representação do processo físico de reflexão da luz. (NEWTON, 2002)

O fenômeno da reflexão consiste na mudança da direção de propagação da energia, desde que o ângulo de incidência não seja zero. (FEYNMAN et al., 1977)

No caso específico da montagem óptica do microscópio confocal o ângulo de incidência é zero, o que tem como consequência o retorno da energia incidente em direção à região de onde ela é oriunda, após entrar em contato com uma superfície refletora.

Este trabalho trata de um aparato de microscopia óptica como uma técnica para caracterização de superfícies. Apesar de técnicas ópticas possuírem origens seculares, o microscópio óptico ainda é um dos instrumentos mais versáteis para resolver padrões característicos da ordem de micrometros. Um microscópio óptico em sua constituição simples é formado por três elementos: uma fonte de luz, um sistema óptico de ampliação e um estágio de visualização. (Figura 2.2)

A complexidade total do sistema é aumentada quando se tenta melhorar a capacidade de ampliação e a qualidade de imagem.

A microscopia confocal, em particular, emprega uma técnica óptica que incrementa o contraste e constrói imagens tridimensionais utilizando uma abertura circular, também denominado de *pinhole espacial* ou *pinhole confocal*. A Figura 2.3 mostra a abertura circular colocada no plano da imagem que possui a função de eliminar a luz desfocada proveniente da amostra.

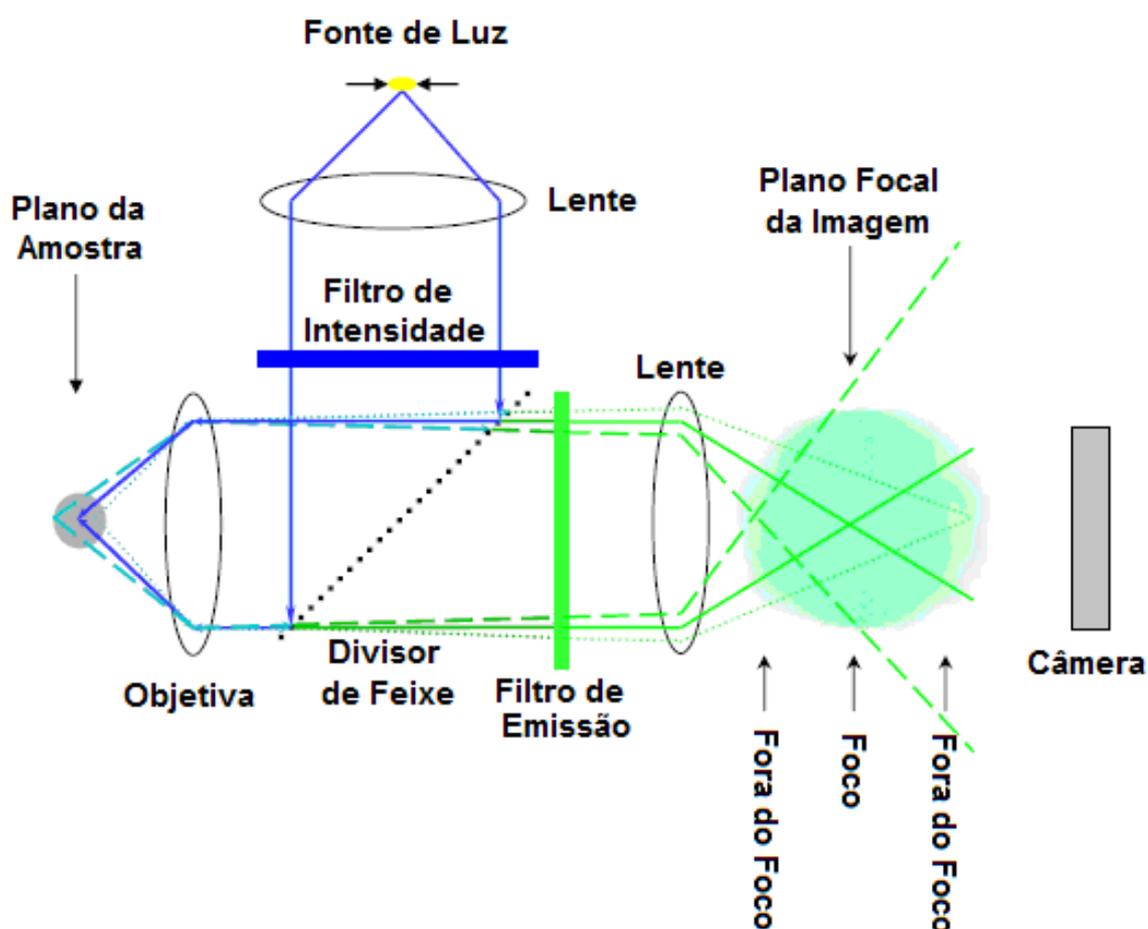


Figura 2.2 – Princípio de funcionamento do microscópio simples (microscópio de campo amplo). (MINSKY, 1988)

Em virtude da abertura circular, a quantidade de luz detectada é muito reduzida em comparação com microscópios de campo amplo, chegando ao máximo de 5% da potência proveniente da fonte de luz. Para compensar a baixa intensidade de luz alguns componentes são incorporados ao microscópio confocal.

Primeiro, o laser, é utilizado como fonte de luz em substituição a lâmpadas convencionais, pois produz luz coerente em comprimentos de onda específico.

Detectores altamente sensíveis também são empregados no MCVL para auxiliar na captura deste sinal reduzido. Um sistema transladador faz com que o feixe incidente percorra a superfície da amostra.

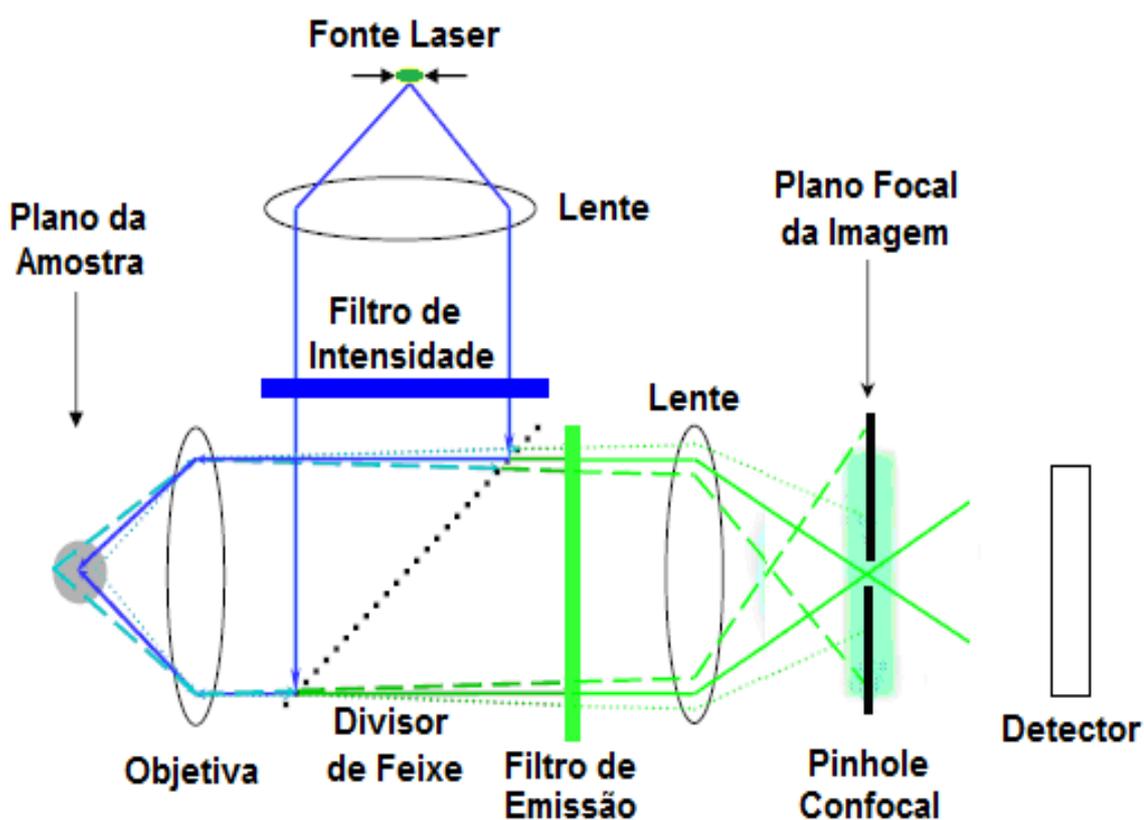


Figura 2.3 – Princípio de funcionamento do microscópio confocal. (MINSKY, 1988)

Pela Figura 2.4 observa-se que o microscópio confocal de varredura laser é um conjunto integrado de equipamentos de última geração.

Componentes de alta tecnologia como microcomputador e *softwares* são utilizados no controle dos posicionadores e também no armazenamento e tratamento de dados.

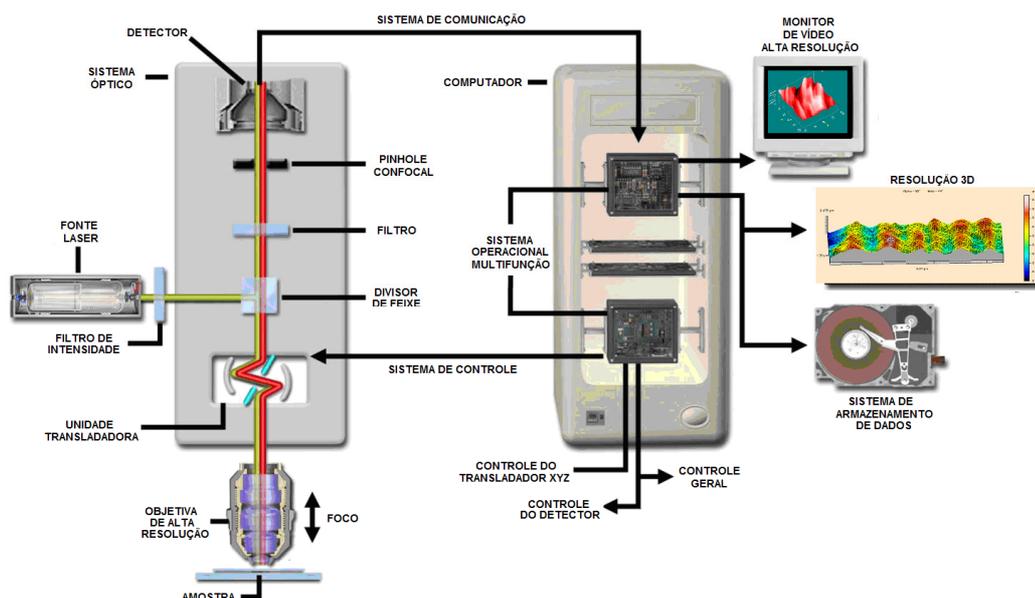


Figura 2.4 – Equipamentos necessários ao funcionamento do microscópio confocal de varredura laser. (Fonte: Site Olympus)

2.1. - Microscópio Confocal de Varredura Laser

A Figura 2.5 demonstra o *Microscópio Confocal de Varredura Laser* (MCVL) desenvolvido neste trabalho.

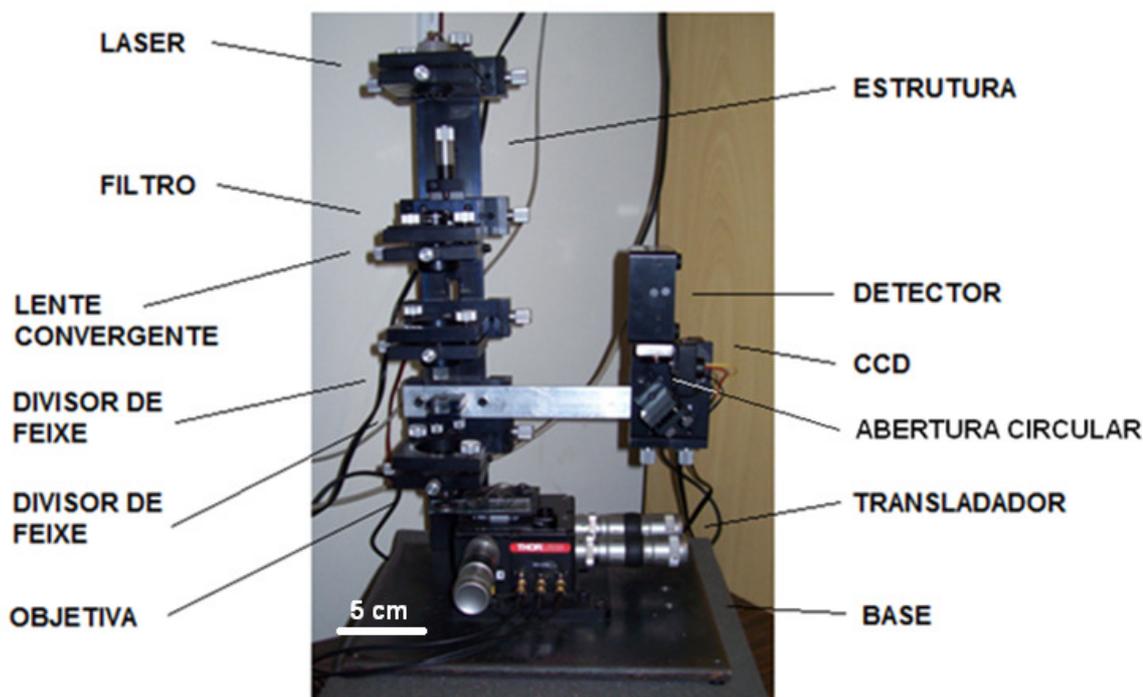


Figura 2.5 – Microscópio confocal de varredura laser desenvolvido.

O microscópio confocal é constituído de uma complexa montagem instrumental, seu desenvolvimento integra várias áreas do conhecimento, abordando desde técnicas de usinagem, eletrônica, montagem mecânica, programação computacional e montagem óptica experimental, ou seja, trata-se de um trabalho multi-interdisciplinar. (OLIVEIRA, 2011)

Os principais componentes de *Microscópio confocal de Varredura Laser* desenvolvido são:

1. Base e Estrutura do Microscópio;
2. Fonte Laser;
3. Filtro Óptico de Intensidade;
4. Sistema de Iluminação da Amostra;
5. Lentes Convergentes;
6. Objetiva;
7. Posicionadores dos Eixos X, Y e Z;
8. Divisor de Feixe;
9. Abertura Circular;
10. Detector;
11. Processador e *Software*;

2.1.1 – Base e Estrutura do Microscópio

Um microscópio deve ter uma boa estabilidade mecânica. Qualquer vibração entre a amostra e o corpo do microscópio deve ser reduzida ao mínimo, uma vez que tais vibrações podem ser aumentadas pelo próprio fator de ampliação do microscópio. Em outros instrumentos uma vibração de milésimos de milímetro entre as partes pode ser completamente desprezível, mas em um microscópio isto poderia se tornar uma característica muito indesejável. Assim, a base e o braço de um microscópio devem fornecer uma estrutura rígida de suporte para a plataforma de amostra e o corpo como um todo e que seja suficiente para resistir às vibrações normais presentes no ambiente.

As partes constituintes da estrutura, peças e acessórios mecânicos desenvolvidos para montagem do microscópio confocal foram usinadas na oficina do Instituto Física da Universidade Federal de Uberlândia. Outros foram adquiridos em empresas de desenvolvimento tecnológico voltadas para pesquisa e desenvolvimento.

A Figura 2.6 mostra a estrutura do microscópio confocal, esta utiliza chapa de Aço ABNT 1020 e alumínio usinadas, pés anti-vibração de fabricação da Vibramat (Figura 2.6.a) e carrinhos de deslizamento e fixação de fabricação da Optron (Figura 2.6.b).

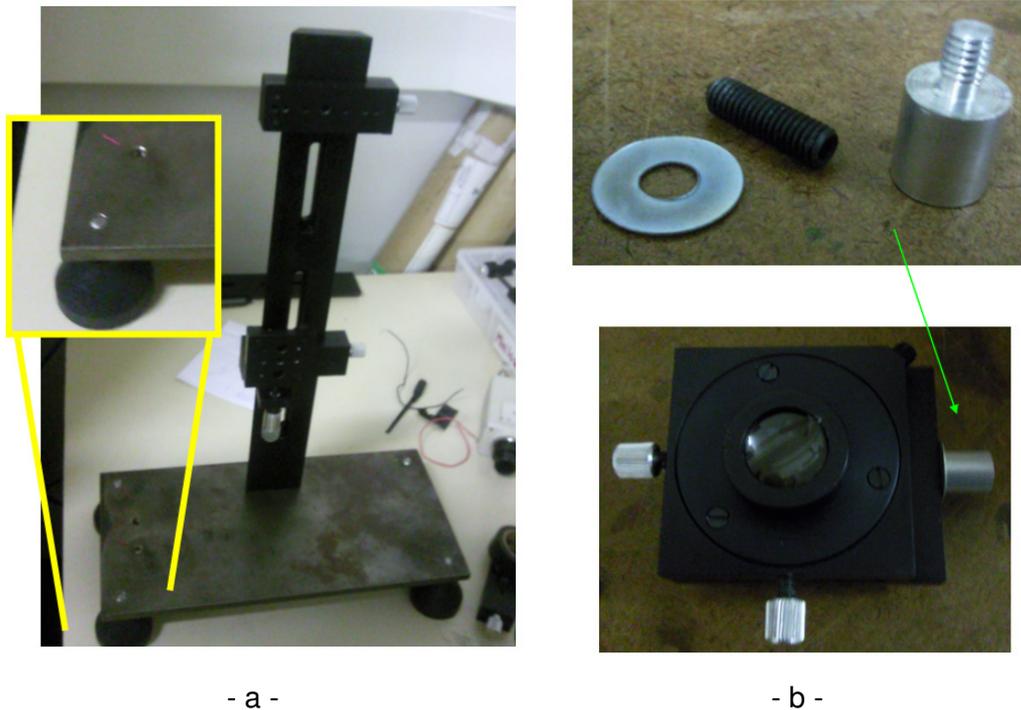


Figura 2.6 – Estrutura do microscópio confocal desenvolvido.

2.1.2 - A Fonte Laser

Foram testadas três fontes laser na montagem do microscópio confocal. Primeiro foi testado um diodo laser de 630 nm, faixa espectral do vermelho, posteriormente testou-se um diodo laser de 532 nm, faixa do verde e um terceiro diodo na faixa do violeta-azul, com comprimento de onda de 405 nm. (Figura 2.7)

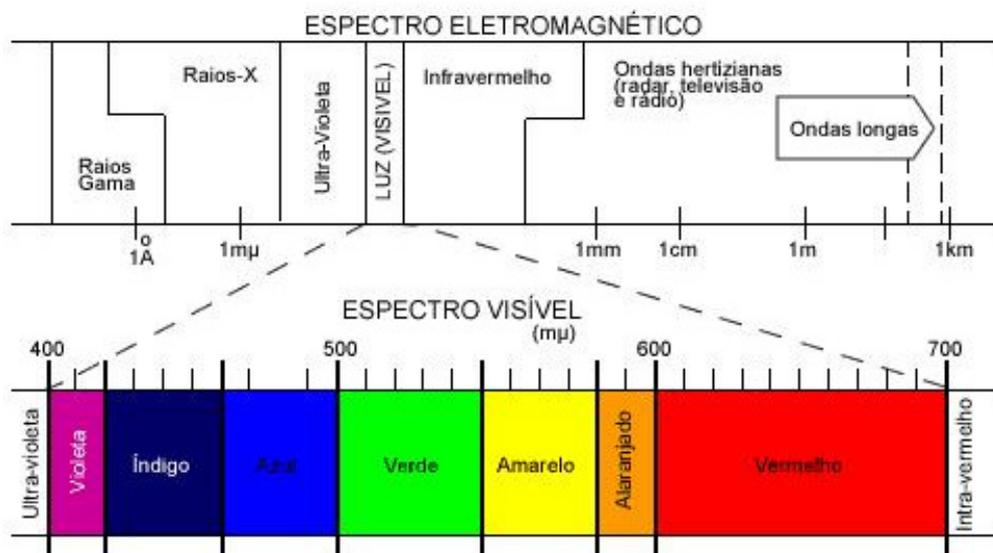


Figura 2.7 – Espectro eletromagnético, em destaque, faixa de espectro visível. (JACKSON, 1999)

Em trabalhos recentes Monte; Cruz; Morais (1997) afirmam que para aplicação em materiais opacos quanto menor o comprimento de onda, menor a difração e maior a resolução.

O diodo verde apresentou bons resultados, porém o seu sistema apresentava aquecimento de um cristal interno responsável por dividir o comprimento de onda gerado pelo diodo (1064 nm) e isto provocava uma variação da intensidade do laser durante a varredura. Esta variação de intensidade é inadmissível em microscopia confocal, pois a construção da imagem *carregará* tais variações. O diodo laser vermelho possui grande aplicabilidade em estruturas translúcidas, como biológicos, onde a absorção da luz é maior.

Assim, o microscópio confocal desenvolvido para análise de superfícies utiliza como fonte de emissão um diodo laser de 405 nm e potência 85 mW, construído com Nitreto de Gálio (*GaN*) em orientações não polares (Figura 2.8), este diodo laser combinado com um conjunto óptico aperfeiçoa a qualidade da imagem e limita a formação de aberrações ópticas. O resultado é a melhor resolução disponível no mercado, resolvendo padrões de 0,2 μm entre linhas.



Figura 2.8 – Diodo Laser LQC405-85E utilizado na montagem do microscópio confocal.

A Figura 2.9 mostra que para o diodo laser utilizado nesta montagem o pico principal possui comprimento de onda de 412,61 nm.

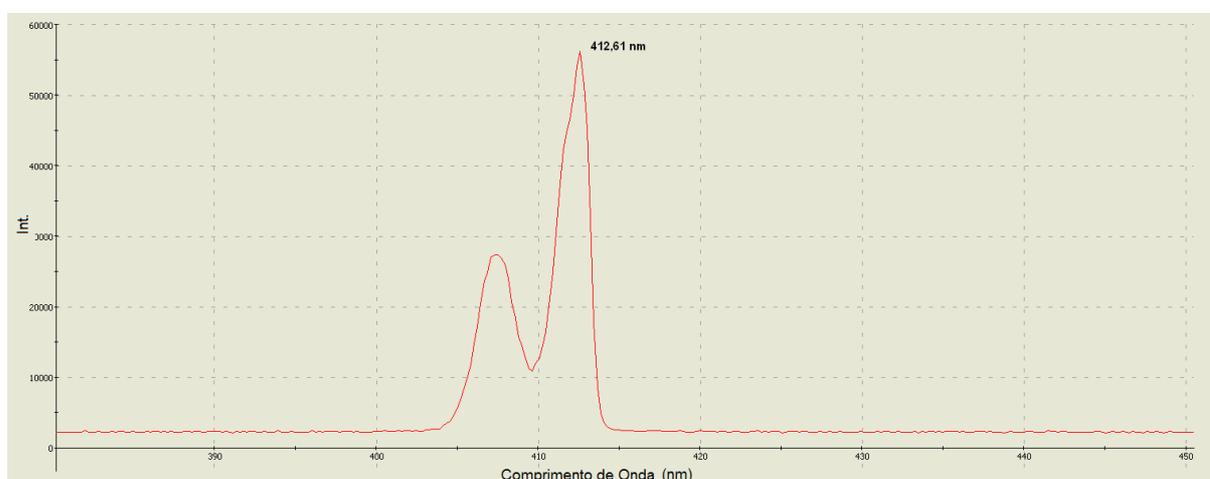


Figura 2.9 - Espectro de emissão do diodo laser utilizado na montagem do microscópio confocal.

A Tabela 2.1 mostra as características do diodo laser utilizado na montagem do microscópio confocal.

Tabela 2.1 – Características do diodo laser utilizado na montagem do microscópio confocal.

Modelo	LQC405-85E
Tipo	Módulo Contido
Comprimento de Onda	405* nm (412,61 nm)
Potência de saída	85 mW
Diâmetro do Feixe (elíptico)	1,5 x 5,25 mm
Ângulo de Divergência do feixe	<1,5 x 0,7 mrad
Ruído	< 0,5%
Estabilidade de energia	Variação < 1% por 8 horas
Centro de Tolerância	± 10 nm
Corrente máxima de operação	3000 mA
Fonte de Alimentação	12 VDC
Temperatura de Operação	0 a 40 °C

2.1.3 – Filtro Óptico de Intensidade

O filtro de intensidade de densidade de absorção neutra é utilizado para diminuir a intensidade do feixe laser sobre a amostra, para que não ocorra saturação do sinal no detector e efeitos ópticos não desejados. Na montagem utilizou-se filtros de intensidade marca ThorLabs (modelos NE510A, NE520A, NE530A, NE540A), substituídos conforme alinhamento realizados e do tipo de superfície a ser digitalizada. (Figura 2.10)



Figura 2.10 – Filtro de intensidade de densidade neutra NE510A, marca ThorLabs, utilizado na montagem do microscópio confocal.

O filtro de densidade neutra é um filtro óptico que reduz a intensidade de todos os comprimentos de onda de forma uniforme. Sua utilização aumenta a flexibilidade ao realizar alterações em outras configurações ópticas do microscópio confocal, como, por exemplo, mudança do comprimento de onda do laser. (Figura 2.11)

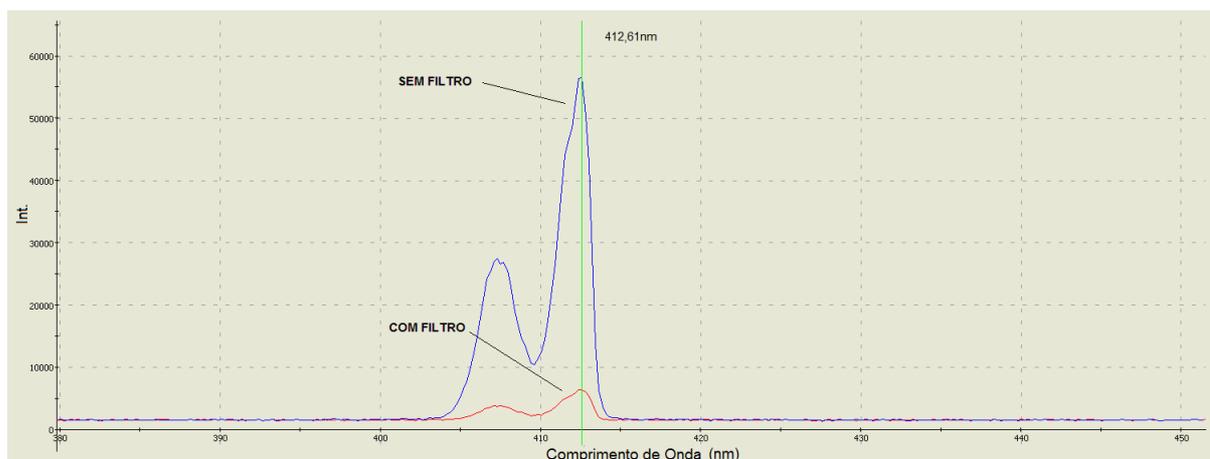


Figura 2.11 – Espectro de intensidade do feixe laser, indicando potencia do laser com relação ao filtro de intensidade.

Na montagem do microscópio confocal o filtro de densidade neutra possui a função de minimizar o efeito da difração na superfície da amostra. O fenômeno da difração da radiação eletromagnética é consequência da natureza ondulatória da luz, a qual pode ter suas frentes de onda distorcidas por um obstáculo de dimensões comparáveis ao seu comprimento de onda, este objeto pode ser uma abertura em um anteparo ou a quina de um objeto opaco no caminho percorrido pelo feixe de luz. A difração no caso particular do microscópio confocal ocorre nas estruturas pertencentes à topografia da superfície da amostra.

Este fenômeno está relacionado com as propriedades de ondas ao transportarem energia de um ponto ao outro do espaço. Segundo o princípio de Huygens (KLEIN; FURTAK, 1986) a variação dos comprimentos totais atravessados por diversas ondas oriundas da original se recombinam ao passar por um dado ponto do espaço. Ao passarem por esse ponto do espaço, ondas difratadas de uma mesma origem têm a mesma fase e por isso pode interagir uma com a outra naquele ponto. A recombinação se processa porque as ondas, exibindo propriedades periódicas ao longo do espaço e ao longo do tempo combinam seus máximos e mínimos de amplitude de uma maneira que depende do total de ondas interagentes e das distâncias totais percorridas.

Na construção da imagem por microscopia confocal o resultado depende da variação destas combinações, por exemplo: dois extremos, um máximo de amplitude se combina com um mínimo, produzindo uma anulação parcial ou total da energia da onda; por outro lado, dois ou mais máximos ou mínimos se encontram, a energia observada é maior.

A Figura 2.12 demonstra imagens construídas via microscopia confocal, onde é observado o fenômeno de difração da luz nos *obstáculos* da topografia da amostra. A Figura 2.12.a foi construída utilizando o microscópio confocal com filtro óptico de densidade neutra

NE510A, a imagem representa a estrutura real da topografia da amostra. Para demonstrar o efeito da difração na microscopia confocal foi construído uma imagem na mesma região, porém sem a utilização do filtro de intensidade, a Figura 2.12.b mostra o artefato de imagem construído pelo fenômeno de difração nas quinas das trilhas que constituem a topografia da amostra.

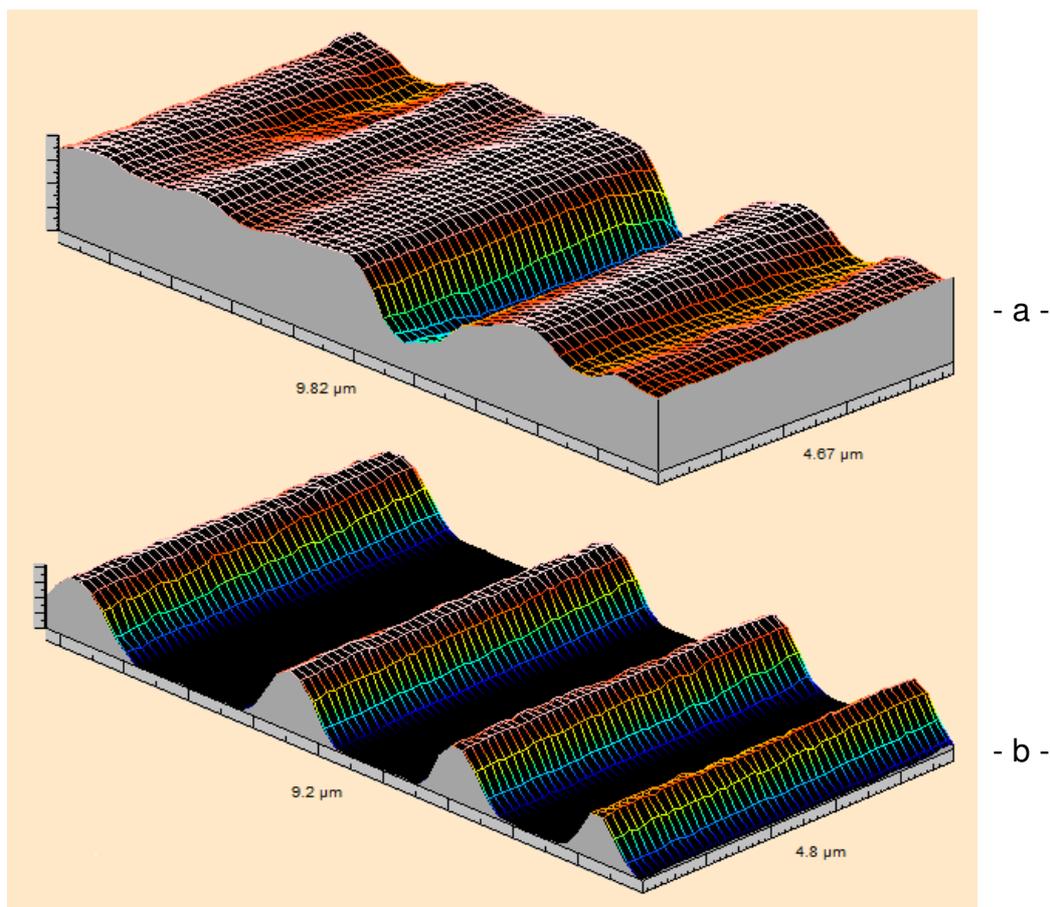


Figura 2.12 – Imagens geradas em uma mesma área; (a) utilizando filtro de intensidade e (b) sem o filtro.

A superfície desta amostra possui estruturas da ordem de 300 nm, que são compatíveis com o comprimento de onda do laser utilizado para varrer a amostra (410 nm). Além da utilização do filtro óptico de densidade neutra, outra forma de se diminuir o efeito da difração, seria diminuir o comprimento de onda da fonte laser. Por outro lado, a difração seria muito menor ou nenhuma caso os obstáculos possuíssem estruturas acima de 500 nm.

Pela Figura 2.12.b observa-se a *suavidade* da superfície construída, característica do fenômeno de difração da luz. Sem a utilização do filtro óptico o fenômeno é amplificado, pois a amostra passa a ter um estado saturado de luz, ou seja, a quantidade excessiva de luz aumenta a difração na superfície da amostra.

2.1.4 - Sistema de Iluminação da Amostra

Com a finalidade de observar a superfície da amostra antes da varredura foi incorporado ao microscópio confocal um microscópio de campo amplo (Figura 2.13).

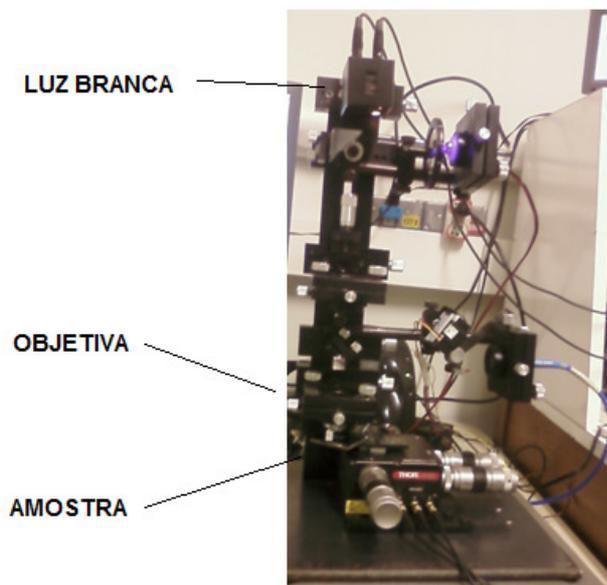


Figura 2.13 – Esquematização da montagem utilizada para o microscópio de campo amplo.

O microscópio de campo amplo é um sistema de iluminação que utiliza uma fonte de *luz branca* (banda larga) com a finalidade de obtermos a imagem da superfície da amostra, para isto utilizou-se uma lâmpada de filamento de tungstênio com potência de 20 watts e uma fonte onde se controla a corrente na mesma; desta forma pode-se observar a superfície da amostra em análise e também possibilita a seleção da região a ser varrida. A imagem é capturada por uma câmera digital CCD (*charge-coupled device*) e visualizada através de uma tela de cristal líquido. (Figura 2.14)

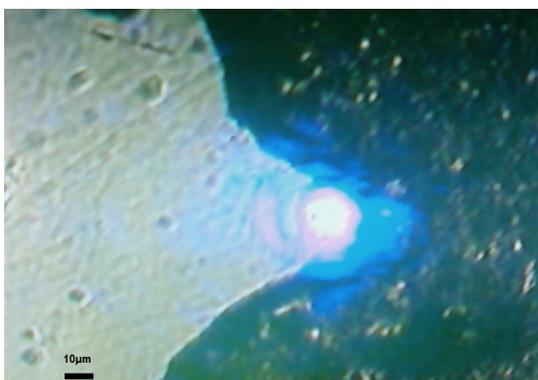


Figura 2.14 – Imagem da tela de cristal líquido demonstrando uma chapa metálica texturizada - detalhe do feixe laser sobre a amostra.

2.1.5 – Lente Convergente

Em uma lente esférica com comportamento convergente, a luz que incide paralelamente entre si é refratada, tomando direções que convergem a um único ponto. (KLEIN; FURTAK, 1986). Tanto lentes de bordas finas como de bordas espessas podem ser convergentes, dependendo do seu índice de refração em relação ao do meio externo. No caso mais comum, a lente possui índice de refração maior que o índice de refração do meio. (Figura 2.15)

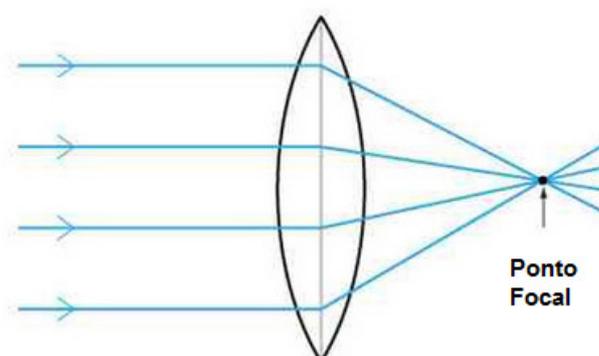


Figura 2.15 – Demonstração da óptica geométrica em uma lente convergente (biconvexa). (NEWTON, 2002)

Uma lente convergente biconvexa foi instalada na montagem do microscópio confocal com a finalidade de colimar o feixe proveniente de diodo laser. O objetivo desta lente é convergir o feixe laser para a objetiva.

2.1.6 – Abertura Circular

Para o funcionamento do microscópio confocal, a abertura circular possui importância fundamental. Esta abertura funciona com um filtro espacial que elimina a luz proveniente da amostra e que esteja fora do ponto focal. (Figura 2.16)

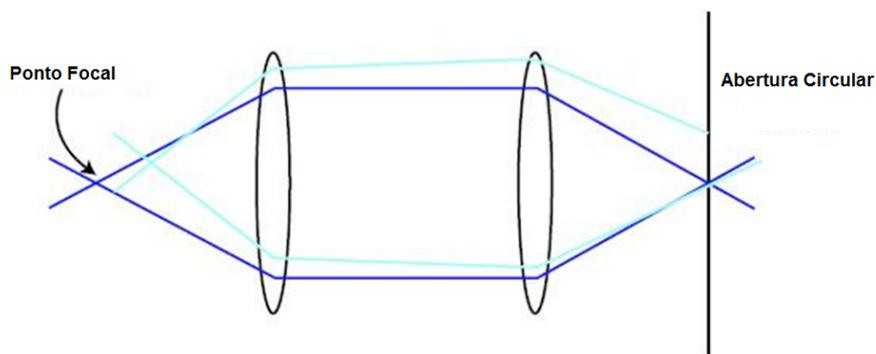


Figura 2.16 – Esquematização da função da abertura circular.

Em um primeiro momento pode-se entender que para aplicação da abertura circular em microscopia confocal deve-se seguir o raciocínio de quanto menor o diâmetro da abertura, menor é a espessura do plano focal, portanto maior qualidade da imagem. Porém, uma abertura circular muito pequeno, com diâmetro inferior a 20 μm , poderá eliminar também a luz necessária para a formação da imagem. (SHEPPARD et al., 1997)

Para aplicação em microscopia confocal, a abertura deve bloquear a luz proveniente de pontos acima ou abaixo do plano de focal. Uma abertura espacial com diâmetro maior que o ideal reduz o efeito óptico deste corte, bem como proporciona a captura de mais fótons pelo detector. A escolha de uma abertura circular com diâmetro abaixo do ideal eliminaria grande parte do sinal necessário para formação da imagem. Uma forma de minimizar este efeito seria aumentar a potencia do laser, porém este ato levaria à saturação do sinal. Pois o máximo central do padrão Airy, região delimitada pela primeira mínimo do padrão de Airy contém 84% da energia luminosa proveniente da fonte. (NATHAN et al., 2009)

O padrão de Airy é um fenômeno óptico relacionado à mecânica de funcionamento da abertura circular. Devido à natureza ondulatória da luz, quando ela passa por uma abertura circular a luz difrata, produzindo um padrão de interferência de regiões claras e escuras. O padrão de difração resultante de uma abertura circular possui uma região central conhecido como o disco de Airy rodeado por uma série de anéis concêntricos, chamado padrão de Airy (ambos nomeados em homenagem ao astrônomo George Biddell Airy). (Figura 2.17)



Figura 2.17 – Representação do padrão de Airy, padrão de difração contendo um máximo central (ordem zero) cercado por discos concêntricos. (Fonte: Site Zeiss)

Em uma primeira etapa da montagem do microscópio confocal, uma fibra óptica com diâmetro de 50 μm foi utilizada como abertura circular espacial. (Figura 2.18)



Figura 2.18 – Montagem utilizando fibra óptica de 50 μm como abertura circular.

A substituição da fibra óptica foi necessária para simplificar a estrutura do microscópio, neste ponto o detector foi acoplado diretamente na estrutura do microscópio e uma abertura circular de 50 μm foi acoplado na entrada óptica de detector. (Figura 2.19)

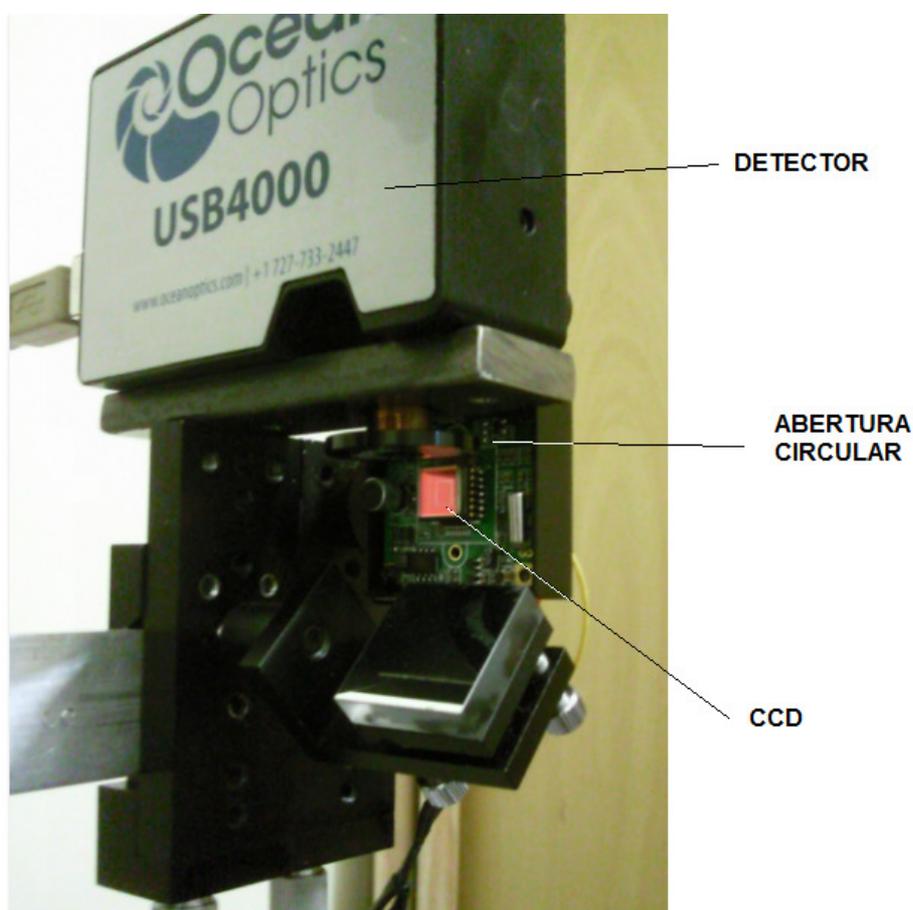


Figura 2.19 – Montagem utilizando uma abertura circular fixado diretamente na entrada do detector.

A abertura circular utilizada na montagem do microscópio confocal é fabricada em uma chapa de aço inoxidável 302 (não magnético) com espessura de 12,5 μm , esta chapa está alojadas em uma estrutura de alumínio com diâmetro externo de 25,4 mm. O diâmetro da abertura é de 50 μm . (Figura 2.20)

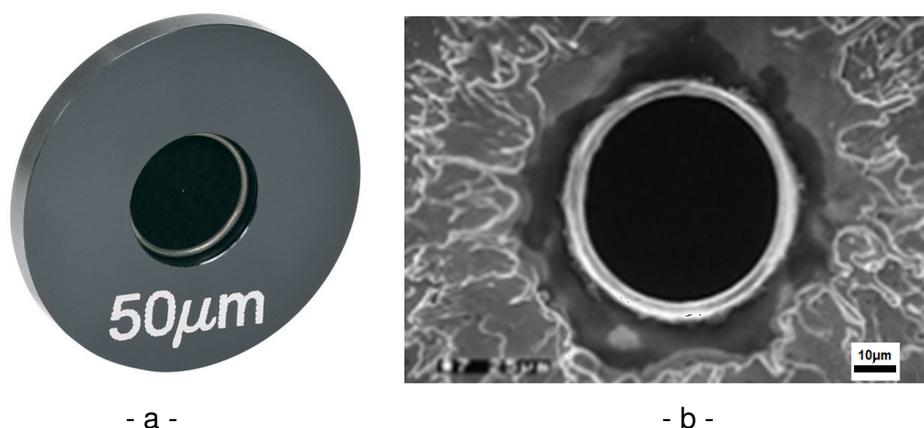


Figura 2.20 – Abertura utilizada na montagem do microscópio confocal (a). Imagem da abertura por microscópio eletrônico de varredura (b). (Fonte: Site Thorlabs®)

2.1.7 – Objetiva

A objetiva é a responsável pela formação da imagem. A abertura numérica da objetiva (AN) determina o diâmetro do feixe laser sobre a amostra. Esta abertura numérica juntamente com o comprimento de onda da luz incidente são os principais responsáveis pela resolução do microscópio confocal. A AN de uma objetiva informa sua capacidade de captar a luz e resolver detalhes a uma distância fixa do objeto. (HAMILTON et al., 1986)

Um *cone de luz* se forma entre a lente da objetiva e a amostra. O ângulo μ de formação deste *cone de luz* determina o valor da distância de trabalho da objetiva (Figura 2.21)

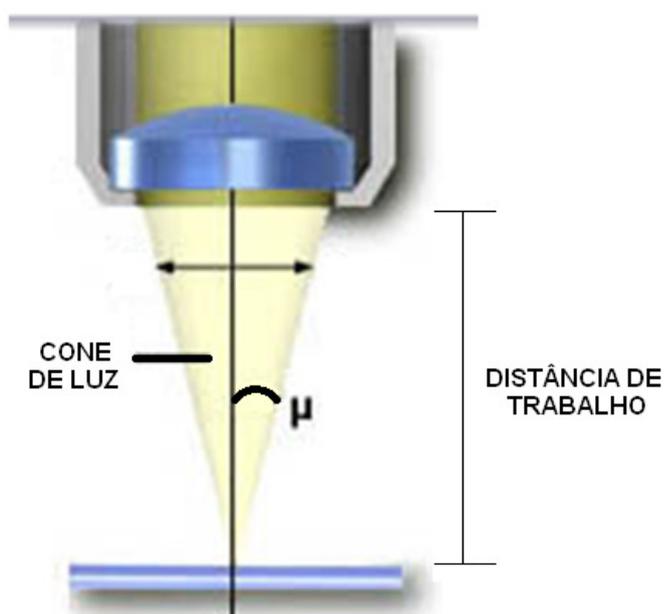


Figura 2.21 – Representação do *cone de luz* formado pelo conjunto lentes da objetiva. (Fonte: Site Olympus)

O ângulo μ está relacionado com a AN através da seguinte Eq. (2.1).

$$AN = n \cdot \text{sen}(\mu) \quad (2.1)$$

Onde n é o índice de refração do meio (entre a lente da objetiva e o plano da amostra).

Pela Eq. (2.1) verifica-se o valor da AN é diretamente proporcional ao índice de refração do meio. O valor do índice de refração pode variar entre 1,00 para o ar e a 1,51 para os óleos de imersão especializados.

Para uma objetiva com funcionamento ao ar, o valor teórico máximo para abertura numérica é de 1,00, na prática é difícil alcançar valores acima de 0,95 para abertura numérica com objetivas *a seco*.

Segundo Sheppard e Wilson (1979) a formação de *aberrações ópticas* em objetivas está diretamente relacionada à capacidade de ampliação de uma objetiva. Em geral, objetivas com fator de ampliação superior a 10X tendem a apresentar aberrações esféricas e cromáticas. Estes *defeitos na imagem* são minimizados em microscopia confocal, uma vez que esta técnica utiliza fontes monocromáticas e a formação da imagem é realizada ponto a ponto, ou seja, se captura um ponto luminoso proveniente do plano focal por vez.

Pelo critério de Rayleigh, a resolução de uma objetiva se determina pela capacidade de separação entre dois discos Airy, ou seja, a capacidade de se distinguir o máximo central do primeiro mínimo entre dois pontos. (Figura 2.22).

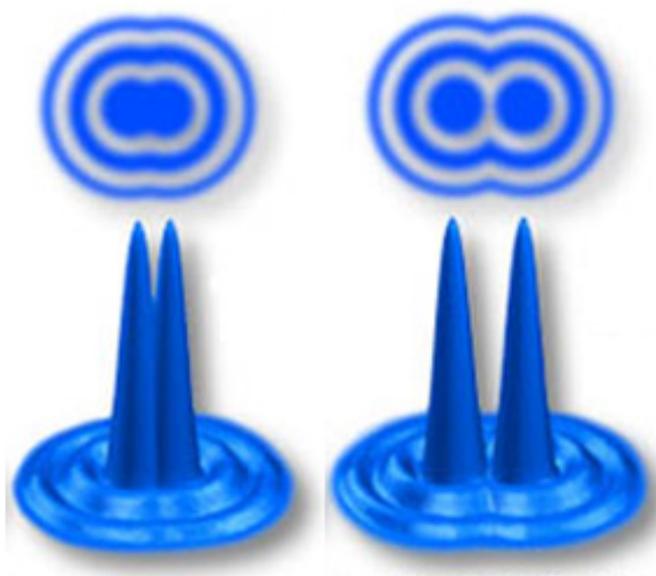


Figura 2.22 - Dois discos de Airy e suas distribuições de intensidade no limite de resolução óptica. (WILHELM, 2011)

A distância entre os máximos centrais deve ser maior que a largura dos mesmos, portanto, objetivas que possuem uma maior AN são capazes de produzir pequenos discos de Airy. (Figura 2.23).

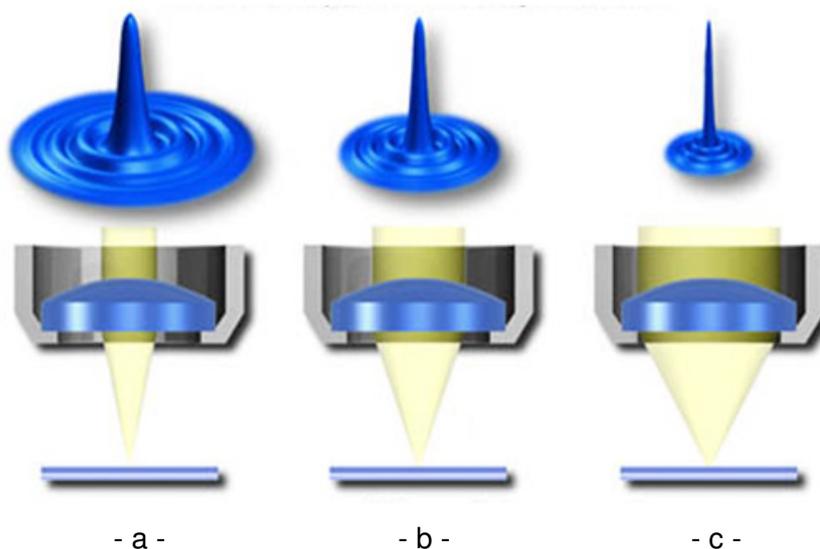


Figura 2.23 - Efeito da abertura numérica sobre a formação dos discos de Airy. (Fonte: Site Zeiss)

Pela Figura 2.23 observa-se que quanto maior a abertura numérica de uma objetiva, menor será a formação do disco de Airy. A Figura 2.23.a mostra uma objetiva com o menor valor para AN com relação às demais (2.23.b e 2.23.c), esta objetiva possui a maior formação do disco de Airy. Esta é a principal razão pela qual uma objetiva de alto valor da AN ser capaz de minimizar *aberrações ópticas*, além de possuir maior capacidade de distinguir dois pontos.

A montagem do microscópio confocal para análise de topografia de superfícies utiliza uma objetiva fabricada pela Mitutoyo, ampliação de 10 vezes e AN de 0,3.

2.1.8 – Resolução do Microscópio Confocal

Resolução de um microscópio é a capacidade deste em distinguir dois pontos ou partes de um objeto. A equação abaixo define o limite de resolução (LR) de um microscópio óptico segundo o critério de Rayleigh.

$$LR = \frac{0,61 \cdot \lambda}{AN} \quad (2.2)$$

onde, λ é o comprimento de onda do laser e AN a abertura numérica da objetiva.

Pela Eq. (2.2) verifica-se que quanto maior a AN melhor o limite de resolução. Pelas características da objetiva utilizada na montagem do microscópio confocal ($AN = 0,3060$), o calculo teórico para o LR da objetiva utilizada é $0,8173 \mu\text{m}$.

Segundo Toy (1990) em microscopia confocal, devido à captura de um único ponto em um único no plano focal a resolução lateral deste equipamento é otimizada em aproximadamente 30% em comparação com microscópio comum. Devido ao estreitamento espacial da função intensidade no ponto, o limite de resolução para o microscópio confocal desenvolvido pode ser estipulado em $0,5359 \mu\text{m}$.

Em testes realizados no microscópio confocal utilizando objetiva de 20 vezes e AN de 0,4, pode-se estimar o limite de resolução em $0,4 \mu\text{m}$.

O limite de resolução do conjunto óptico utilizado na montagem do microscópio confocal está relativamente próximo do limite de resolução imposto pelas limitações físicas, que é $0,2 \mu\text{m}$ para objetiva montada *a seco*, onde a AN é de aproximadamente 0,8 e o comprimento de onda na faixa do ultravioleta ($\lambda \sim 380 \text{ nm}$).

2.1.9 – Transladores

Para se realizar a varredura da amostra pelo laser é necessário transladar a amostra. Para montagem do microscópio confocal foi utilizado um translador piezoelétrico, modelo *Nano Max302 TS* e controladora *3-Axis Piezo Controller MDT-302*, ambos marca Thorlabs. (Figura 2.24 e 2.25)



Figura 2.24 – Translador piezoelétrico utilizado na montagem, modelo Nano Max302 TS - Thorlabs.

O princípio de funcionamento do translador *Nano Max302* basea-se na dilatação em três direções de um cubo cerâmico piezoelétrico. A Tabela 2.2 mostra características deste componente do microscópio confocal, onde a mais relevante para este trabalho é a repetibilidade, ou seja, a capacidade do equipamento retornar ao ponto de origem, com um desvio mínimo, após um deslocamento.

Tabela 2.2 – Características do piezo posicionador *Nano Max302 TS*. (Fonte: Site *Thorlabs*)

Modelo	Nano Max302 TS
Capacidade de Carga	1 Kg
Faixa do Piezoelétrico	10 ou 20 μm
Faixa do Ajuste Fino (Manual)	4 mm
Repetibilidade (RMS)	15 nm
Força de Atuação do PZT	250 N
Dimensões Larg. x Comp. x Alt.	110 X 110 X 62.5 mm
Dimensões da Plataforma	60 x 60 mm

O piezo atuador translada a amostra e a unidade de digitalização detecta o sinal do feixe refletido na amostra, este sinal é detectado ponto a ponto (eixo X) e linha por linha (eixo Y) como representado na Figura 2.26.

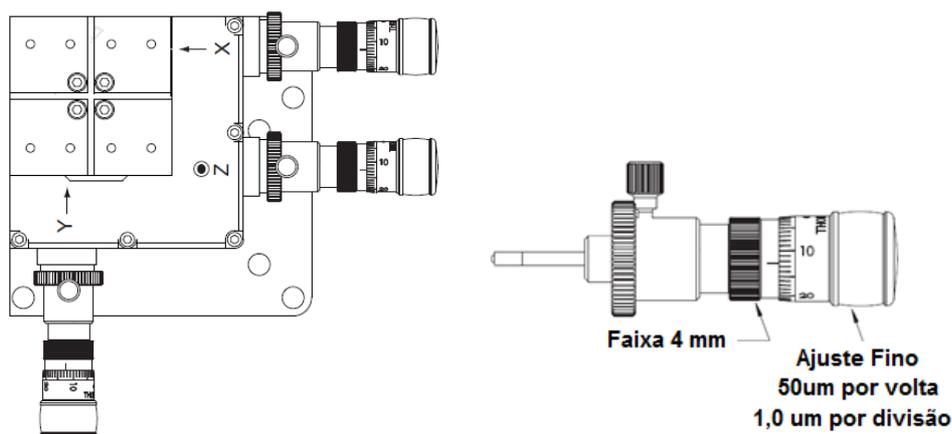


Figura 2.25 – Ilustração do piezo atuador e sistema de ajuste manual. (Fonte: Manual Thorlabs® - Nano Max302 TS.)

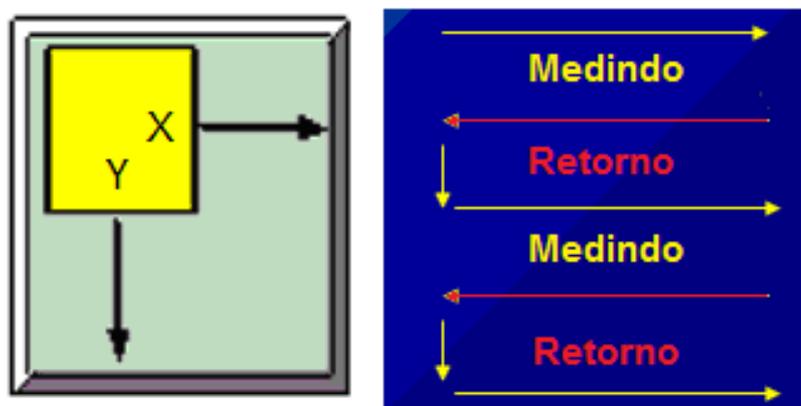


Figura 2.26 – Representação do movimento do translador piezoelétrico.

2.1.10 – Divisor de Feixe

Na primeira montagem do MCVL o modo de seleção de imagem para o detector ou para o microscópio comum era realizado através de um movimento manual de um espelho. (Figura 2.27.a)

Esta montagem utiliza um espelho seletor que possui a função de direcionar o feixe laser para o detector durante a varredura ou devia-lo para a CCD na fase de ajuste da amostra no equipamento.

Em uma segunda montagem foi adaptado um motor (Figura 2.27.b) ao espelho que era responsável por automatizar o processo anterior. A placa controladora mostrada na figura 2.27.c enviava os comandos para o movimento do espelho seletor de imagem.

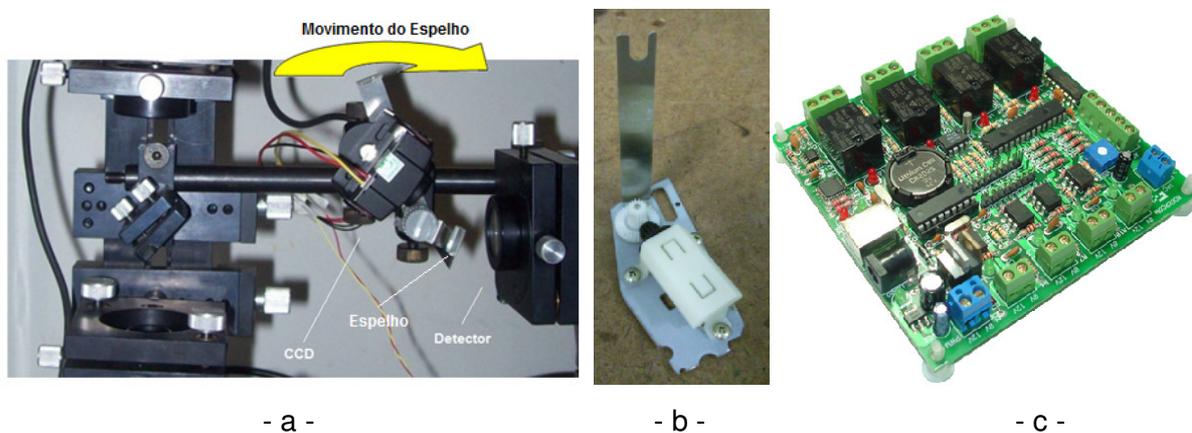


Figura 2.27– Montagem do espelho seletor de imagem. Funcionamento manual (a) e automatizado (b). Placa controladora modelo R-Control 30, fabricante Rogercom.

As duas montagens mostradas na Figura 2.27 foram abandonadas, pois não possibilitavam a visualização simultânea da superfície da amostra pelo microscópio comum e a captura do sinal pelo detector.

Neste ponto do trabalho, foram instalados dois divisores de feixe na montagem do microscópio confocal.

O primeiro divisor de feixe possui a função de direcionar o feixe proveniente da reflexão na amostra para o detector. O segundo possui a função de direcionar o feixe refletido para a CCD (microscópio comum). (Figura 2.28)

Pela Figura 2.28.a verifica-se na cor verde a representação do feixe incidente, na cor vermelha, representação do feixe refletido na amostra.

A montagem atual possibilitou o acompanhamento do deslocamento do feixe laser durante a varredura, porém acrescentou duas pequenas dificuldades, geradas pela perda de sinal nos divisores de feixe.

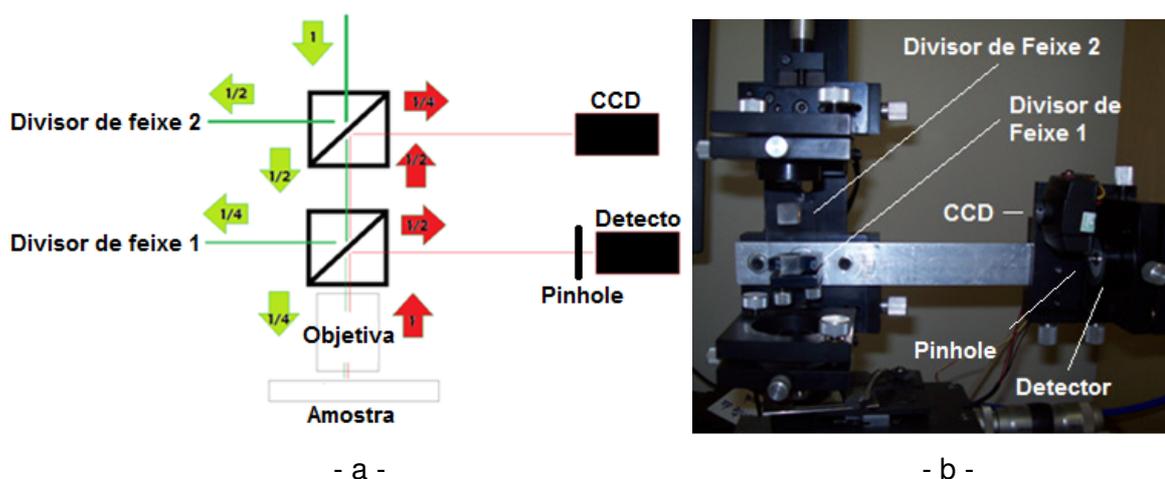


Figura 2.28 – Distribuição do sinal no divisor de feixe (a). Em destaque os dois divisores de feixe(b).

Primeiro, a Figura 2.28.a mostra que um quarto do sinal que chegar a este estágio do microscópio incide sobre a amostra e aproximadamente um quarto do sinal proveniente da reflexão na amostra chega ao sistema de detecção, ou seja, a cada passagem pelo divisor de feixe, este distribui 50% da intensidade do feixe em uma direção perpendicular.

A segunda dificuldade encontrada na incorporação do divisor de feixe ao MCVL está relacionada ao fenômeno de refração da luz em meio material.

O fenômeno óptico da refração ocorre quando o feixe de luz é transmitido de um meio para outro com índice de refração diferente. Nesta mudança de meios, a frequência da onda luminosa não é alterada, porém a velocidade e o comprimento de onda são alterados. Com a alteração da velocidade de propagação ocorre um desvio da direção original. (Figura 2.29)

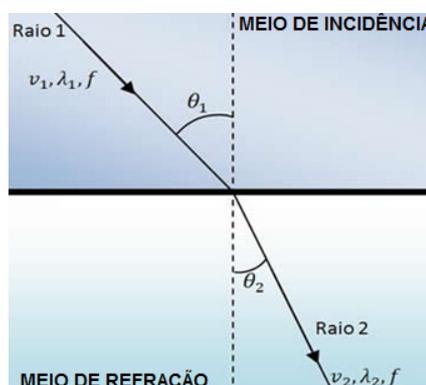


Figura 2.29 – Fenômeno de difração. (HALLIDAY, 2001)

O *Raio 1* é o raio incidente, com velocidade e comprimento de onda característico, o *Raio 2* é o raio refratado, com velocidade e comprimento de onda característico, a reta

tracejada representa a linha normal à superfície, onde o ângulo formado entre o *Raio 1* e a reta normal é o ângulo de incidência. O ângulo formado entre o *Raio 2* e a reta normal é o ângulo de refração. O raio refratado está no plano de incidência e tem um ângulo de refração θ_2 que está relacionado com o ângulo de incidência θ_1 através da Eq. (2.3).

$$n_2 \text{ sen } \theta_2 = n_1 \text{ sen } \theta_1 \quad (2.3)$$

onde n_2 e n_1 são os índices de refração do meio onde a luz está se propagando.

A Eq. (2.3) é conhecida como *lei de Snell*. Na propagação da luz em meios materiais há a interação da mesma com a matéria. Em qualquer meio material a velocidade da radiação monocromática (v) é menor que a velocidade da radiação monocromática no vácuo (c), a Eq. (2.4) determina o valor para o índice de refração.

$$n = \frac{c}{v} \quad (2.4)$$

No vácuo o índice de refração (n) é definido como exatamente 1,0; no caso do ar em condições normais de temperatura (0°C) e pressão (1 atm), o valor é ligeiramente maior, sendo que na prática quase sempre se supõe que o valor de n para o ar seja igual a 1,0. Não existe nenhum meio com índice de refração menor que 1,0. (HALLIDAY, 2001)

Pela Figura 2.29, n_2 é maior que n_1 , e conseqüentemente θ_2 é menor que θ_1 . Neste caso, a refração desvia o feixe luz, aproximando-o da normal. Este fenômeno ocorre ao longo do caminho óptico do feixe laser no microscópio confocal. Além dos divisores de feixe, a refração da onda eletromagnética está presente na lente convergente e na objetiva. Para estes meios ópticos utilizados no MCVL calcula-se que o índice de refração esteja entre 1,3 e 1,5 (Vidros de baixa dispersão e comprimento de onda do laser de 410 nm).

2.1.11 - Aquisição de Sinal

Para se construir a imagem durante a varredura da superfície da amostra é necessário um sistema de detecção de sinal que possibilite o registro de cada ponto varrido.

O MCVL necessita de um sistema de detecção com capacidade de integração da ordem de milissegundos, do contrário, o tempo de varredura será grande o bastante de forma a inviabilizar a técnica. Outro ponto importante está relacionado à capacidade de detecção, pois como grande parte da luz é eliminada pela abertura circular, o nível de sinal é relativamente baixo, o que leva a um aumento da relação sinal ruído.

Em trabalho recente Pawley (1995) afirma que a realização de médias estatísticas de vários quadros do mesmo ponto leva a uma melhora da qualidade final da imagem. Portanto, o tempo de integração do detector influencia diretamente na qualidade da imagem construída pelo microscópio confocal, quanto maior este tempo, mais fótons detectados e menos ruído na imagem. Nos resultados mostrados neste trabalho o tempo de integração foi sempre de 100 ms.

No caso do microscópio confocal desenvolvido o detector utilizado foi um espectrômetro modelo USB4000, fabricado pela Ocean Optics Inc. (Figura 2.30)



Figura 2.30 – Espectrômetro Ocean Optics Inc. – USB4000, utilizado para montagem do Microscópio Confocal.

O espectrômetro USB4000 possui um obturador eletrônico para tempos de integração de até 3,8 ms. Este espectrômetro utiliza um detector Toshiba de resolução de 0,1 nm. A Tabela 2.3 mostra outras características deste acessório do MCVL.

Tabela 2.3 – Característica do espectrômetro marca Ocean Optic, modelo UBSB4000, utilizado na montagem do Microscópio Confocal. (Fonte: Manual Ocean Optics UBS4000)

Modelo	UBSB4000
Dimensões Larg.x Comp. x Alt.	63,3 x 89,1 x 34,4 mm
Peso	190 g
Detector	Toshiba TCD1304AP
Faixa do Detector	200 a 1100 nm
Ruído-Sinal	1:300
Conector de fibra óptica	SMA 905–0,22
Distância focal	42 mm
Tempo de integração	de 3,8 ms à 10 s
Interfaces de computador	USB 2.0 - 480 Mbps
Corrente e tensão	250 mA e 5 VDC

2.2 – Montagem da Imagem Virtual da Superfície da Amostra

Em trabalho recente Gu (1996) demonstra que construção virtual da superfície de uma amostra é realizada pelo deslocamento de feixe laser sobre a amostra e pelo sincronismo da captura do sinal de reflexão sobre a mesma. Para tanto, é necessário que o feixe translate sobre a superfície da amostra de forma precisa. (Figura 2.31)

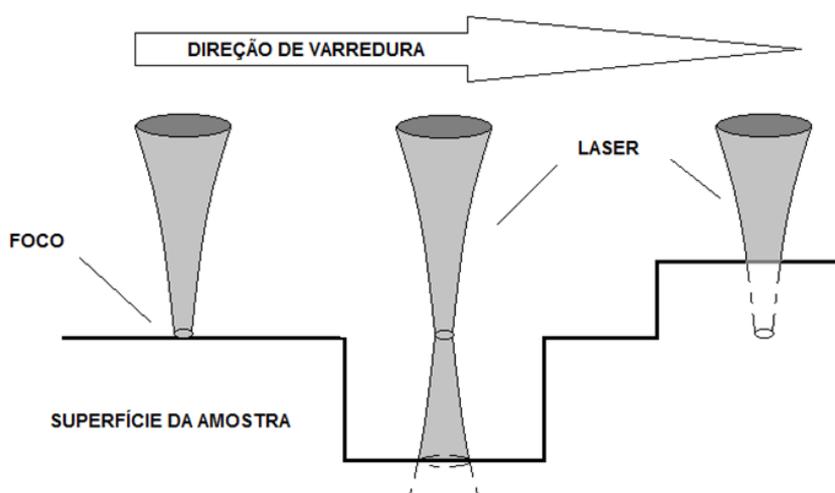


Figura 2.31 – Representação esquemática do sistema de varredura laser sobre a superfície da amostra.

Em pontos mais próximos do foco concentra-se maior intensidade de sinal, portanto a reflexão também possui maior intensidade.

O espectrômetro detecta o sinal luminoso proveniente da reflexão na amostra e converte em sinal digital, este registro é montado em uma matriz XY com valores de intensidade da luz refletida, como demonstrado no exemplo da Figura 2.32.

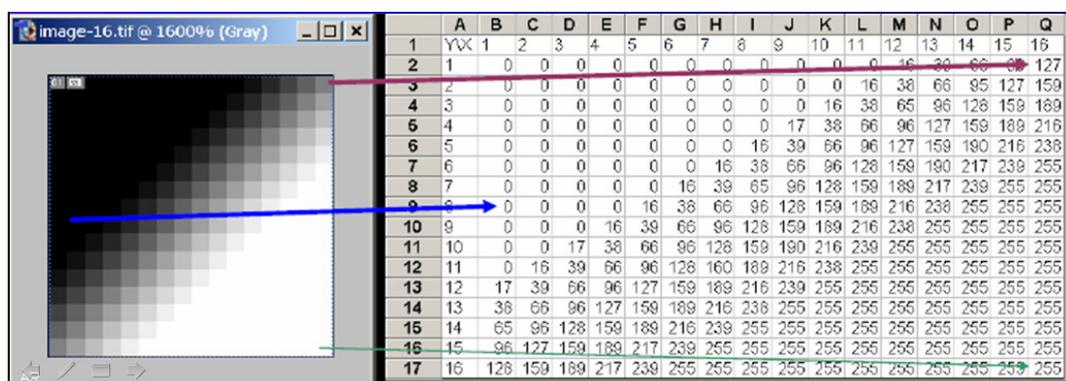
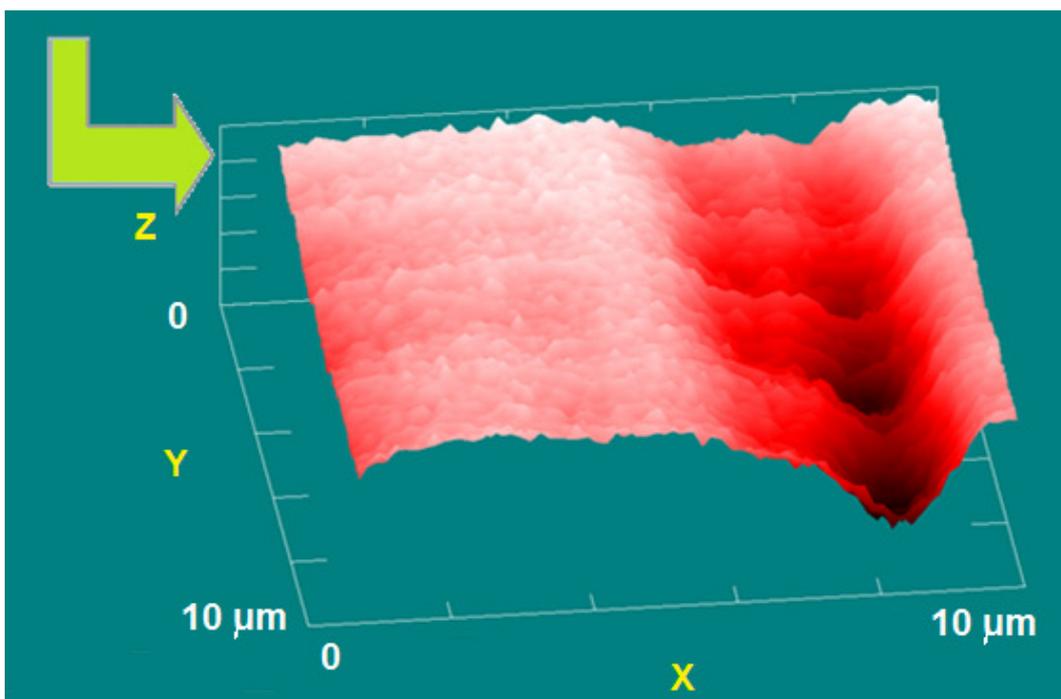


Figura 2.32 – Exemplo de níveis de cinza utilizando imagem 16bits, variação do preto ao branco (imagem binária). (GU, 1996)

Através da matriz *XY* da Figura 2.33.a se obtém a imagem da superfície da amostra da Figura 2.33.b. A matriz *XY* contém em cada célula de sua matriz o valor da intensidade da reflexão detectada pelo espectrômetro. Na superfície da amostra (Figura 4.5.b) foram varridos 75 colunas e 75 linhas, totalizando 5625 pontos.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1	133.995	184.914	196.563	206.852	222.107	233.085	188.789	201.727	204.893	233.366	182.216	169.719	199.299	179.799	156.572	189.720	128.170	223.065	176.672	163.046
2	70.728	157.751	126.084	180.118	239.768	224.954	175.004	200.857	216.563	192.566	207.232	205.613	235.733	173.865	103.435	125.853	179.849	164.175	157.321	209.759
3	102.246	187.820	212.027	233.415	209.010	138.680	223.924	266.073	223.765	183.185	232.166	161.037	181.836	179.480	221.067	157.062	172.736	191.217	188.090	247.850
4	132.156	155.113	247.041	157.282	270.169	128.071	178.830	243.655	213.695	237.082	231.587	196.932	205.173	128.330	218.430	155.383	151.937	156.413	162.336	184.435
5	200.378	188.531	249.469	153.396	215.683	201.248	154.255	181.957	154.134	149.349	159.950	152.306	203.865	136.902	169.200	160.767	208.339	143.964	217.351	181.957
6	208.190	189.230	224.794	208.151	207.012	223.065	183.846	210.078	212.236	236.223	248.241	140.128	207.821	145.573	118.360	120.678	207.540	160.008	135.043	197.991
7	157.541	134.535	210.788	200.659	134.105	191.316	195.264	197.780	182.607	272.536	284.334	257.182	237.021	207.331	188.162	189.758	116.852	190.617	247.922	168.590
8	207.100	140.888	132.745	175.813	269.508	204.193	119.819	257.710	150.918	181.627	179.979	255.024	252.387	146.272	218.441	226.842	187.231	186.692	98.480	188.851
9	124.014	275.123	213.046	190.837	229.539	209.919	148.001	270.317	124.344	144.763	195.484	225.713	220.428	200.807	192.566	189.549	174.575	104.447	61.887	217.681
10	148.050	180.818	189.329	211.097	142.726	147.670	198.490	141.218	220.148	190.149	259.879	203.186	272.646	215.903	208.399	205.134	190.248	204.094	160.239	155.862
11	114.495	191.327	135.883	147.461	202.266	149.889	199.728	165.452	169.779	190.788	233.575	273.615	228.400	202.657	182.827	209.869	203.186	235.353	210.458	142.286
12	154.734	114.104	100.259	129.349	130.319	104.234	107.250	81.607	182.156	230.799	202.646	161.637	243.435	260.947	201.358	300.888	170.798	259.498	179.160	188.590
13	198.859	101.167	175.043	75.782	121.966	134.375	165.563	160.938	196.172	124.675	133.235	241.139	201.617	221.606	228.829	200.279	232.066	225.014	157.640	196.232
14	74.923	164.924	171.057	147.891	154.045	137.441	178.940	150.258	153.963	95.183	171.585	152.416	223.385	148.540	234.913	138.300	199.090	204.083	202.547	162.557
15	130.477	245.472	150.528	139.489	228.939	161.527	151.997	181.687	239.009	122.137	116.103	120.458	191.696	209.109	57.471	74.824	264.773	112.657	209.280	149.239
16	168.899	182.277	196.111	198.401	244.624	208.790	202.905	246.022	144.494	186.422	190.309	169.719	183.135	162.276	149.889	146.872	151.018	195.313	236.102	210.078
17	146.911	83.825	140.937	205.971	190.628	262.406	204.105	114.044	152.906	170.837	189.169	163.944	204.953	141.647	86.562	171.756	166.201	144.554	135.823	223.654
18	132.217	99.009	155.713	233.146	250.608	256.961	236.333	258.051	220.907	155.113	171.338	171.976	204.523	182.486	122.076	192.197	162.716	155.493	160.079	127.081
19	158.719	147.681	195.902	194.994	242.587	257.501	288.011	251.148	233.746	189.599	202.696	168.100	218.122	152.157	113.994	189.808	171.657	179.799	202.536	241.497
20	167.671	143.723	121.316	192.026	233.525	160.349	207.012	226.732	206.632	189.890	204.584	203.626	149.509	137.172	192.786	140.618	209.809	189.599	156.033	138.869
21	142.925	121.487	190.127	158.400	198.699	180.768	181.897	232.606	215.804	215.853	250.460	230.239	175.703	187.661	126.392	175.692	137.711	102.615	135.652	168.959
22	107.630	147.290	127.791	112.965	149.129	198.319	185.183	206.082	232.606	225.912	184.104	150.577	212.776	188.420	93.305	171.117	153.176	96.763	158.929	167.781
23	171.965	113.835	89.799	123.216	140.068	134.584	155.983	171.068	175.175	197.042	214.295	211.377	161.896	196.172	170.567	92.496	115.283	157.861	173.127	161.257
24	208.988	179.678	94.214	163.834	76.481	107.851	209.539	126.723	205.812	209.968	236.752	225.543	202.316	209.330	155.703	169.539	209.379	221.546	170.148	196.761
25	90.338	99.229	119.329	226.801	141.868	144.334	219.080	101.387	217.940	254.473	184.495	151.458	125.913	165.691	137.441	169.119	160.178	113.984	148.590	123.425
26	76.212	49.379	161.026	125.583	132.366	86.352	157.800	117.501	159.369	180.438	162.826	169.130	203.775	217.731	150.379	191.867	209.858	178.450	177.410	179.150
27	69.258	59.388	78.689	127.570	127.950	139.578	162.226	144.125	247.850	202.057	204.843	138.410	188.151	262.417	229.160	162.986	168.310	124.774	167.500	184.154
28	89.788	48.300	7.511	8.359	100.947	91.357	99.818	172.296	152.966	123.364	206.423	259.400	254.484	283.535	224.315	192.506	180.487	129.729	154.205	82.466
29	36.540	95.981	56.112	44.204	84.233	84.783	127.950	82.735	135.652	186.582	236.702	228.730	172.736	239.939	197.152	179.860	160.019	142.776	161.637	191.966
30	105.032	70.167	112.304	31.476	35.621	70.767	106.392	158.290	174.564	212.457	178.450	201.407	276.742	276.792	172.097	263.105	188.470	195.643	194.234	202.266
31	79.917	66.990	88.659	105.131	83.853	70.866	99.059	141.356	170.506	158.840	164.605	147.841	267.532	234.973	222.537	186.593	190.518	201.578	183.416	240.627

- a -



- b -

Figura 2.33 – Imagem gerada pelo software LabVIEW® a partir da matriz *XY* obtida na varredura.

2.2.1 – Software Laser Scanning Confocal Microscope – LabVIEW

Para controle e aquisição de dados o MCVL utiliza-se a ferramenta da *National Instruments LabVIEW®*. Nesta plataforma foi desenvolvida uma tela de interface com o usuário, onde se configura os parâmetros iniciais de varredura e visualiza-se em tempo real a criação da imagem virtual da superfície em análise. Pela Figura 2.34 observam-se alguns

dos principais parâmetros de entrada: *Start Position* (Posição inicial dos eixos *X* e *Y*); *End Position* (Posição final dos eixos *X* e *Y*); *X-Step*: (Valor do passo nos eixos *X* e *Y*); *Number of Surface* (Número de superfícies a serem construídas); *Z-Step* (Valor do passo no eixo *Z*); *T-Set* (Tempo de integração do espectrômetro); *Detection WL* (Comprimento de onda a ser detectado).

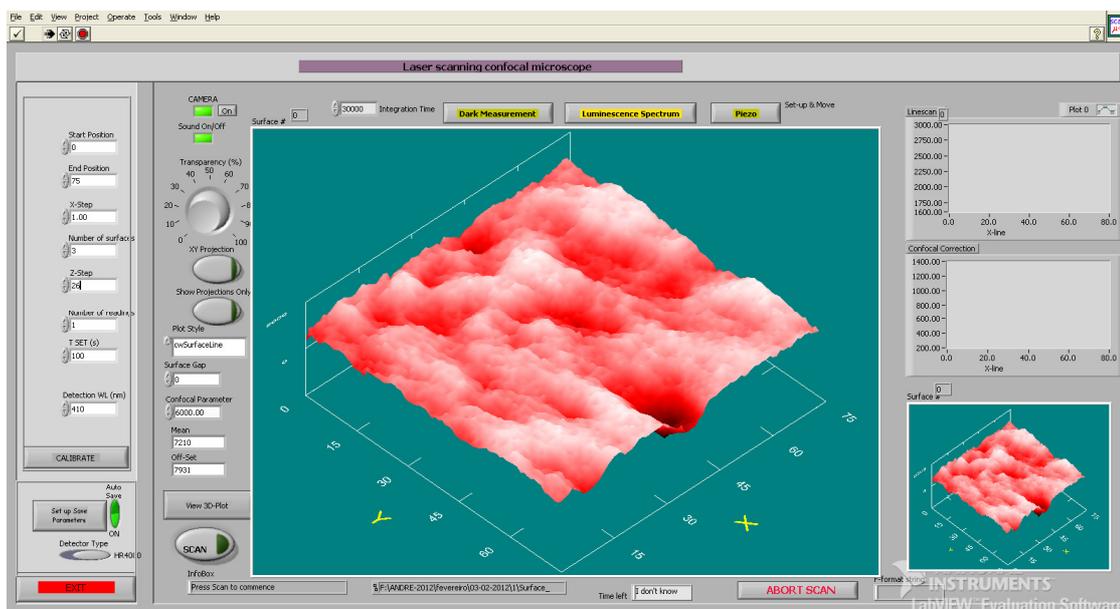


Figura 2.34 – Tela principal do software *Laser Scanning Confocal Microscope – LabVIEW®*.

A Figura 2.35 amostra a tela do *Dark Measurement* onde se realiza o ajuste fino do foco sobre a amostra. Nesta tela verifica-se o faixa de ruído e nível do sinal detectado pelo espectrômetro.

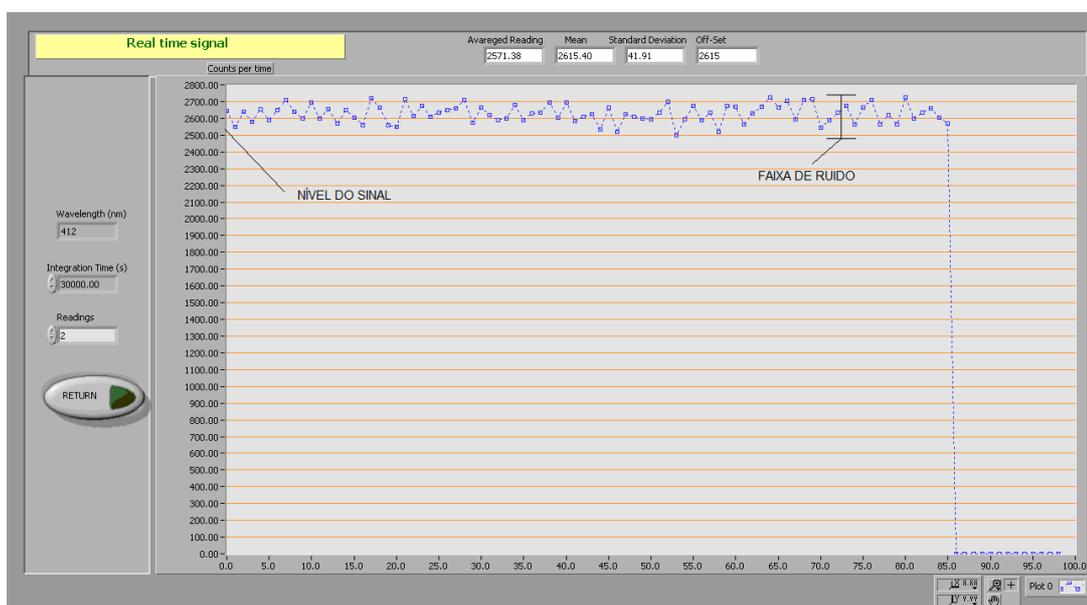


Figura 2.35 – Tela do *Dark Measurement*, sinal em tempo real.

Neste microscópio confocal o ajuste fino é importante na construção de uma imagem, observe pelo exemplo da Figura 2.36 que a curva de intensidade pelo deslocamento no eixo Z possui um formato gaussiano, onde o ponto de máximo trata-se do ponto focal.

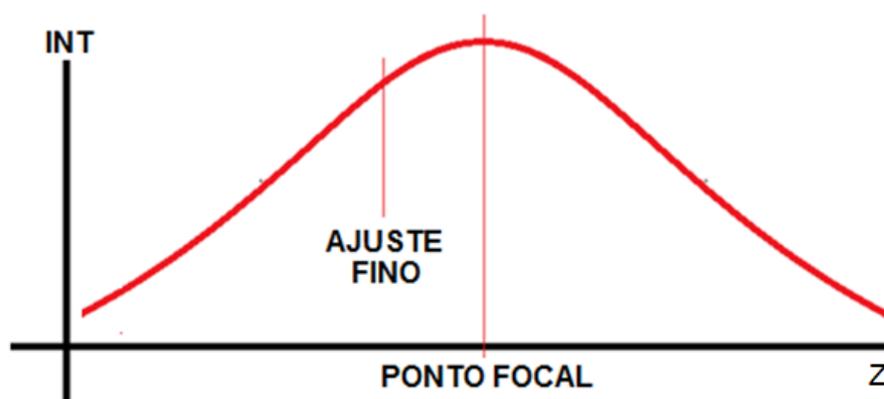


Figura 2.36 – Demonstração da aproximação do sinal ao ponto focal.

2.2.2 – Determinação do Fundo de Escala do Eixo Vertical

Com a finalidade de determinar o fundo de escala do eixo Z , foi implementada a técnica de deslocamento do eixo vertical com a finalidade de induzir uma variação da intensidade de reflexão para um ponto XY específico. Esta variação de intensidade é diretamente proporcional ao deslocamento no eixo Z . (Figura 2.37)

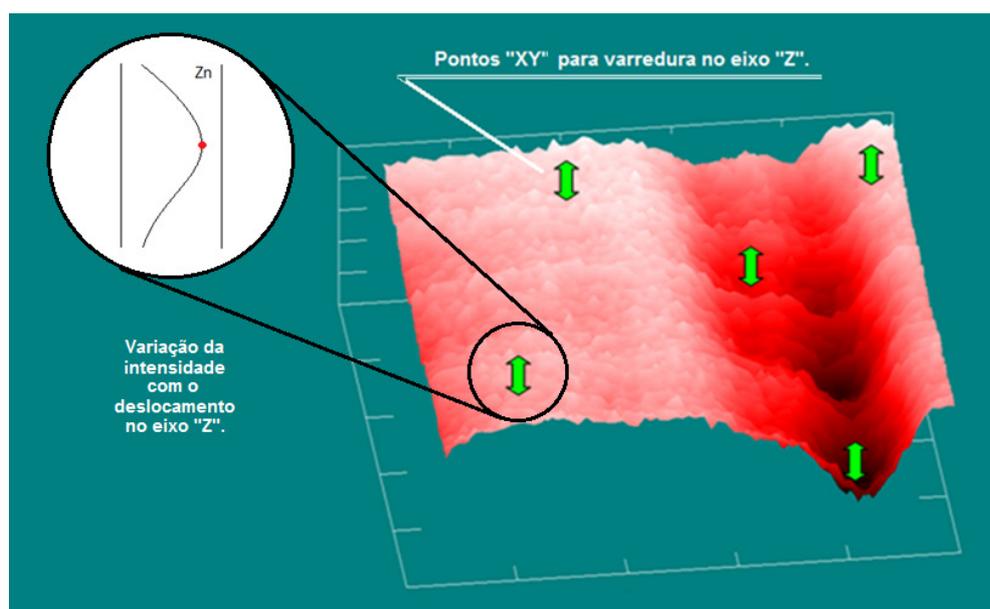


Figura 2.37 – Imagem demonstrando a varredura no eixo Z em cinco pontos (X_i, Y_j) da matriz.

A Figura 2.38 mostra um exemplo onde é possível descrever todas as variáveis utilizadas no cálculo do fundo de escala do eixo vertical. Sobre uma amostra padrão foi realizada varredura na direção do eixo Z e também na direção do eixo X , pela vista frontal verifica-se o formato gaussiano da curva e pela vista lateral verificam-se as estruturas da amostra.

Pela vista lateral observam-se também os valores de intensidade no ponto de máximo da superfície (I_MAX), a intensidade no ponto de mínimo da superfície (I_MIN) e valor mínimo registrado no detector ($DARK$).

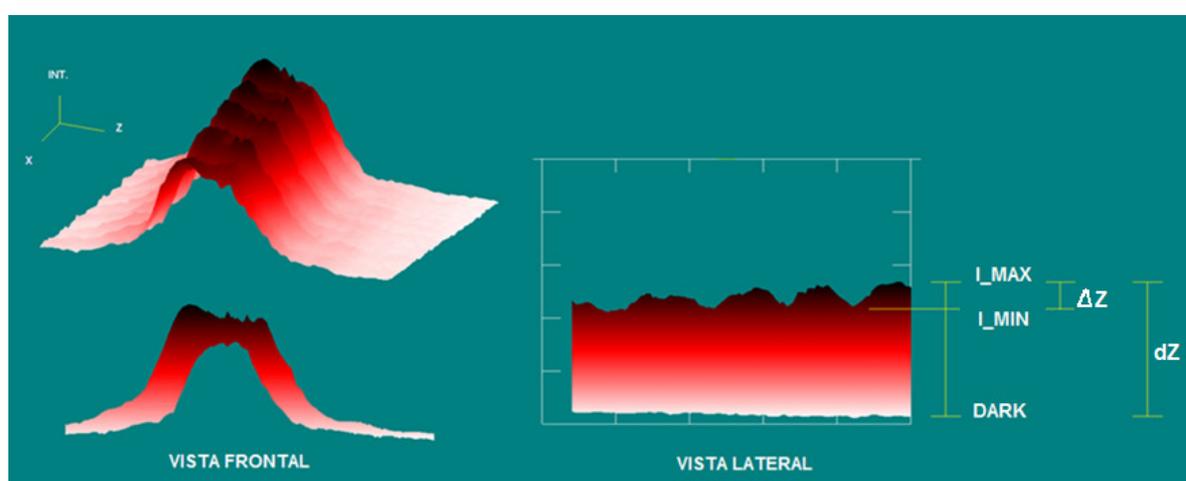


Figura 2.38 – Demonstração da variação da intensidade de reflexão na amostra pelo o deslocamento no eixo Z .

O valor do deslocamento no eixo Z é denominado dZ , para os resultados contidos neste trabalho seu valor é de $10\ \mu\text{m}$. O valor de ΔZ trata-se do valor procurado para o fundo de escala do eixo vertical.

Com os valores da variação de intensidade e de deslocamento é possível se determinar o valor do fundo de escala para o eixo vertical. O algoritmo da Figura 2.39 descreve o fluxo de tratamento de dados até se obter este valor.

O algoritmo determina o fundo de escala a partir da variação da intensidade dos pontos máximos e mínimos da superfície da amostra. Para isto a Eq. (2.5) descreve o cálculo aplicado.

$$\Delta Z = k \cdot \frac{di \cdot dz}{\Delta I} \quad (2.5)$$

Onde o fator ΔI é a variação entre a intensidade no ponto de máximo da matriz (I_MAX_M) e o valor mínimo registrado pelo detector (I_MIN_M ou $DARK$), o dZ é o valor do

deslocamento real no eixo Z , o valor de di é calculado pela variação entre a intensidade do ponto de máximo da superfície (I_MAX) e o valor da intensidade para o ponto mínimo da superfície (I_MIN), o valor de k é determinado como uma constante de correção experimental, onde seu valor é de 0,3183.

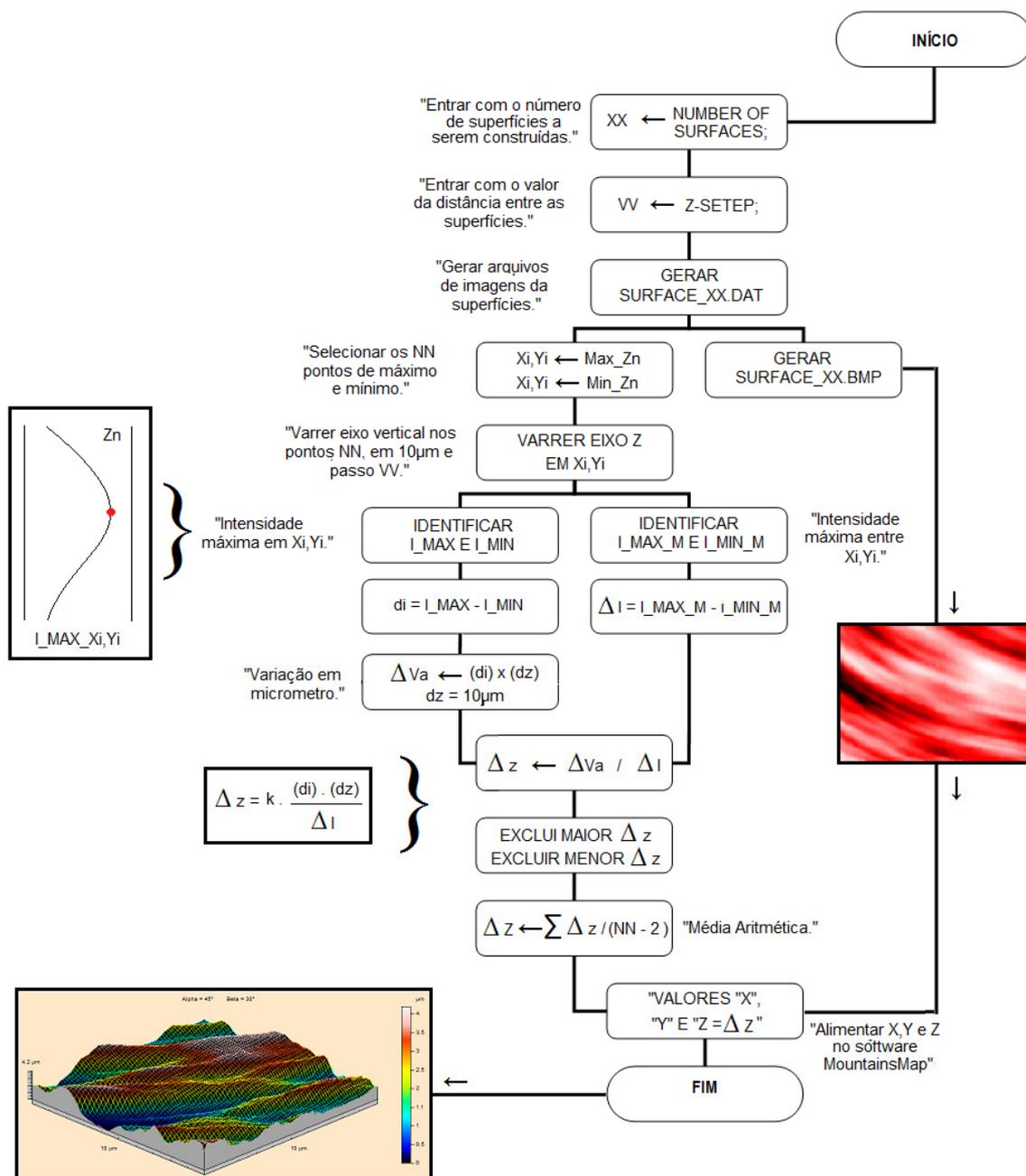


Figura 2.39 – Algoritmo para se determinar o valor do fundo de escala do eixo Z .

Após a determinação do fundo de escala do eixo Z é possível idealizar investigações voltadas ao estudo da topografia de superfície, ou seja, o cálculo de parâmetros topográficos de superfície.

2.3 – Cálculo de Parâmetros Topográficos de Superfície

Para a determinação de parâmetros topográficos que quantifiquem uma superfície existem cálculos matemáticos e estatísticos baseados em normas técnicas que estabelecem definições e procedimentos para a avaliação das mesmas.

A *International Organization for Standardization* (ISO) é uma organização, reconhecida e aceita internacionalmente no estabelecimento de normas técnicas desenvolvidas e avaliadas no âmbito de competência de suas delegações nacionais.

O INMETRO representa o Comitê Brasileiro de Certificação (CBC) na ISO, ele possui a responsabilidade de divulgar, avaliar e preservar a aceitação, o uso e integridade da marca ISO.

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) é o organismo de certificação brasileiro, credenciado pelo INMETRO, para atuação em certificação de sistemas de garantia de qualidade e de produtos no país.

Com relação aos cálculos de parâmetros topográficos de superfície, no Brasil existe a norma equivalente a ISO 4287:1998, a ABNT NBR ISO 4287:2002, intitulada *Especificações geométricas do produto (GPS) - Rugosidade: Método do perfil - Termos, definições e parâmetros da rugosidade*. Esta norma especifica termos, definições e parâmetros para a determinação do estado da superfície (rugosidade, ondulação e perfil primário) pelo método do levantamento do perfil.

Os cálculos dos parâmetros topográficos extraídos dos equipamentos: microscópio de força atômica, interferômetro a laser e microscópio confocal de varredura laser, tiveram seus dados tratados pelo *software Digital Surf Mountains Map Universal 3.0.11*. Este *software* de análise de topografia de superfície é compatível com vários instrumentos de medição de superfície e tratam os dados provenientes de medições de acordo as normas técnicas internacionais.

2.4 – Configurações Utilizadas nas Técnicas Experimentais

As imagens geradas pelo AFM foram varridas em 10 x 10 μm utilizando o modo *não contato* com resolução real de 10 nm.

As imagens construídas pelo IL neste trabalho foram varridas com taxa de aquisição de 5000 pontos/mm, o que corresponde a uma resolução da mesa de 0,2 μm .

Para construir as imagens, o microscópio confocal varreu-se 75 pontos por linha em 75 linhas para uma área de 10 x 10 μm , o que corresponde a passos de 0,13 μm . O tempo

de integração ajustado no espectrômetro foi de 100 ms.

Nos resultados apresentados neste trabalho os parâmetros topográficos foram calculados sobre superfícies onde foram aplicados filtros de forma e rugosidade. Para subtrair a forma da superfície primária utilizou-se filtro polinomial de ordem 2 e a partir deste foi aplicado filtro gaussiano com *cut-off* de 800 nm.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com a finalidade de se identificar a capacidade de construção de imagens do microscópio confocal desenvolvido, utilizou-se como amostra uma chapa de aço ABNT 1020 contendo duas regiões com texturas diferentes, uma região polida e outra atacada quimicamente. Os resultados obtidos demonstram que as imagens são fortemente dependentes do setor onde se realizou a varredura. (Figura 3.1)

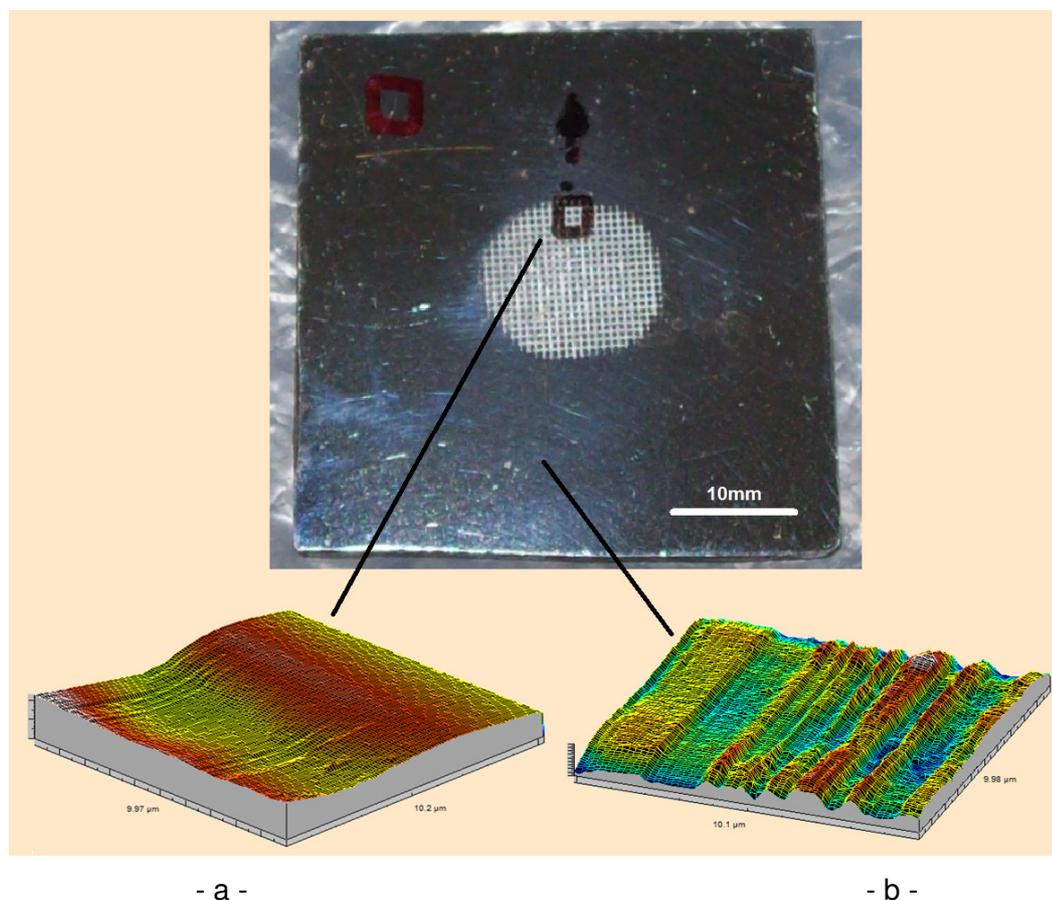


Figura 3.1 – Imagens de superfícies primárias geradas pelo microscópio confocal de regiões com texturas diferentes.

A Figura 3.1.a mostra uma região da chapa de aço ABNT 1020 atacada quimicamente, a ação do ácido promove na superfície da chapa uma textura homogênea. A Figura 3.1.b mostra uma região da chapa que passou por um processo de polimento, pela imagem gerada pelo microscópio confocal observam-se as marcas provenientes deste processo.

Até este ponto do desenvolvimento do equipamento ainda não se conseguia determinar o valor para o fundo de escala do eixo Z. Na tentativa de estimar um valor para este eixo foi realizado uma comparação entre as imagens geradas pelo microscópio confocal e o interferômetro laser. Nesta comparação, utilizou-se uma área específica, onde foi realizado um microsulco na superfície da chapa (Figura 3.2). A Figura 3.2.a demonstra a imagem produzida pelo interferômetro laser para o microsulco.

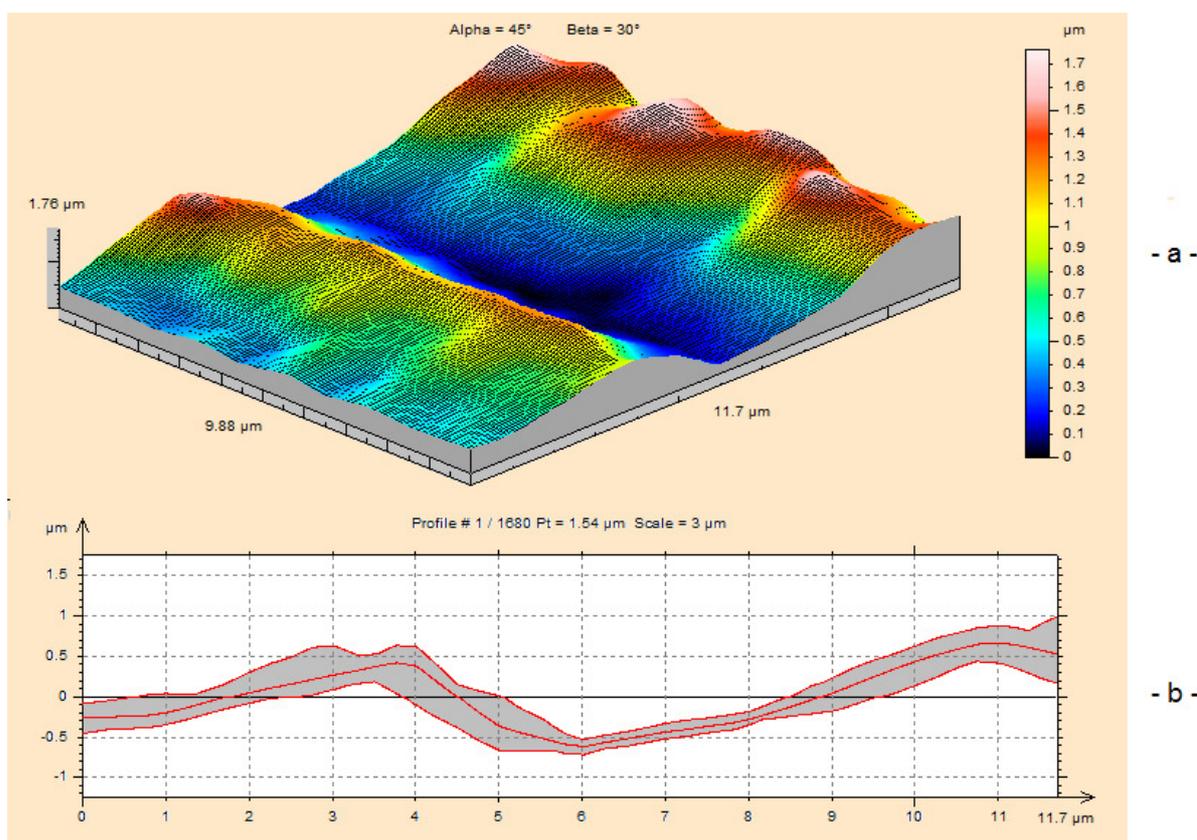


Figura 3.2 – Imagem gerada pelo interferômetro laser (a) e demonstração de todos os perfis ao longo do microsulco (b).

Pela Figura 53.b verifica-se as linhas máxima, média e mínima referente aos perfis traçados de *norte a sul* na imagem da Figura 3.2.a, ou seja, na direção perpendicular ao microsulco. Desta forma obtem-se artificialmente através do interferômetro laser o valor de fundo de escala para o eixo vertical. A variação máxima entre os picos mais altos e os vales mais profundos é de 1,76 μm .

A Figura 3.3 mostra a imagem do microsulco construída pelo microscópio confocal, observa-se os valores para os eixos X e Y , variando de 0 (zero) a 75 volts, que corresponde a variação da tensão aplicado no translador piezoelétrico. Sabe-se que o deslocamento correspondente a 75 volts é $10\ \mu\text{m}$. O eixo Z informa os valores referentes à intensidade da reflexão da amostra.

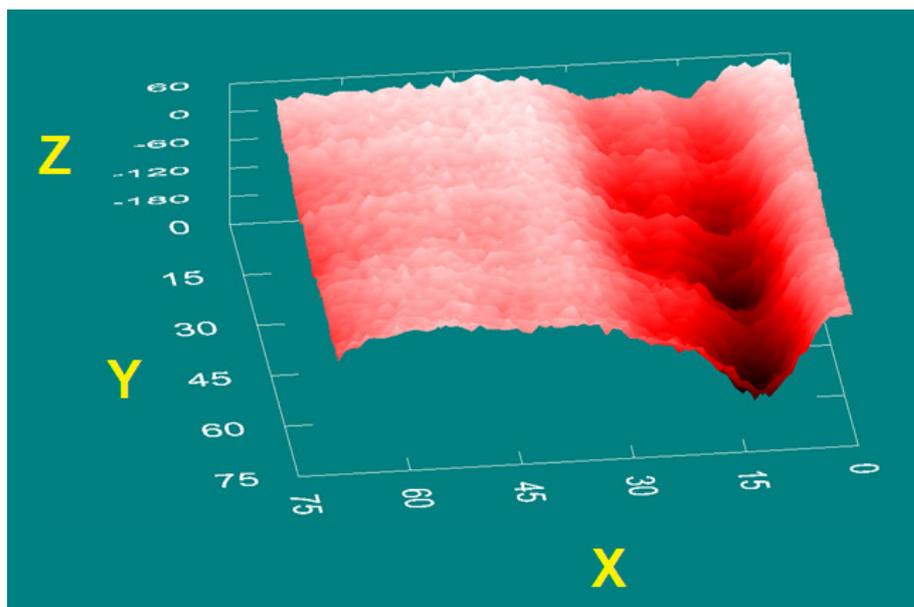


Figura 3.3 – Imagem obtida com microscópio confocal e gerada pelo LabVIEW®.

A Figura 3.4 mostra a imagem final gerada pelo microscópio confocal e tratada no software *Mountains Map*®, nesta imagem pode-se visualizar o valor do fundo de escala para os três eixos.

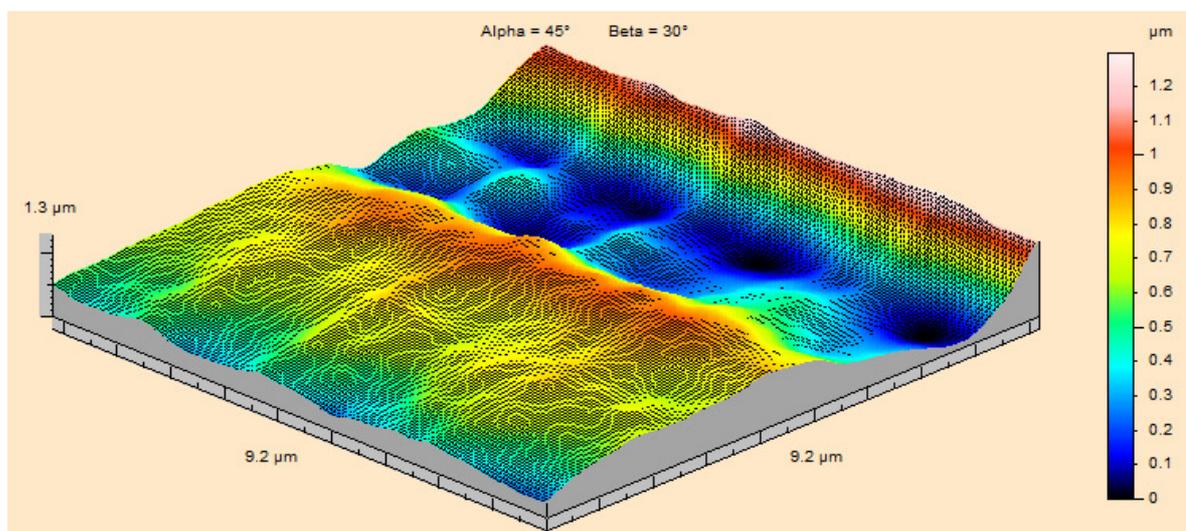


Figura 3.4 – Resultado da imagem gerada pelo microscópio confocal, com valores de fundo de escala para os três eixos.

Na busca de um padrão de comparação entre os resultados obtidos pelo interferômetro laser e microscópio confocal, procurou-se por uma superfície *simples*, ou seja, uma superfície livre de eventos particulares.

A superfície de um disco rígido utilizado para armazenamento de dados em computadores possui uma superfície *quase livre* de imperfeições superficiais, contendo estruturas da ordem de $100\ \mu\text{m}$ de altura. (Figura 3.5)

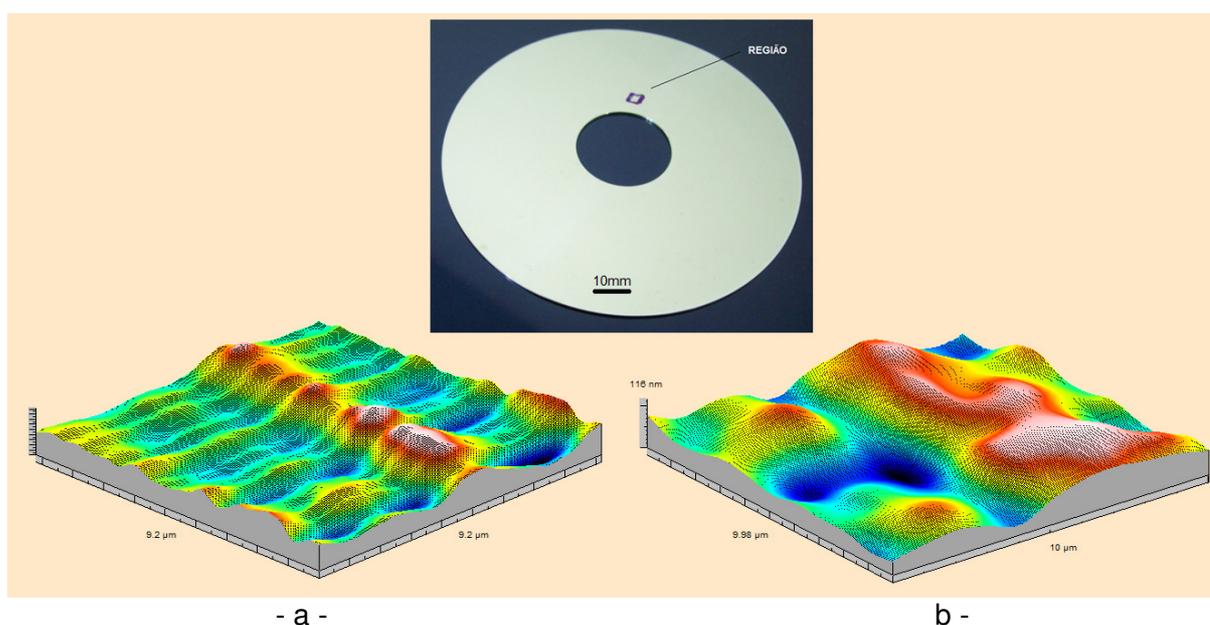


Figura 3.5 – Imagens da superfície de um disco rígido geradas por microscopia confocal (a) e interferometria laser (b).

A Figura 3.5 mostra que para uma superfície simples, sem grandes imperfeições, como a superfície do disco rígido, as imagens geradas pelas técnicas de IL e MCVL são comparáveis, porém é evidente a necessidade de se determinar o fundo de escala para o eixo vertical do microscópio confocal de forma a possibilitar análises também em nível quantitativo.

No intuito de se confirmar a faixa de deslocamento dos eixos horizontais, utilizou-se como padrão de referência uma rede de difração com distância nominal de $0,5\ \mu\text{m}$. (Figura 3.6.a)

A Figura 3.6.b demonstra através de uma imagem gerada pelo microscópio confocal, um distanciamento médio entre as grades da rede de difração de $0,55\ \mu\text{m}$, confirmando o valor de referência da rede.

Neste ponto do trabalho se verificou a necessidade de analisar amostras com características submicrométricas, compatíveis com a faixa de operação do microscópio confocal. Padrões utilizados na calibração do microscópio de força atômica possuem tais

características, desta forma, foram utilizadas amostras padrão com estruturas nos formatos de bolsos e trilhas.

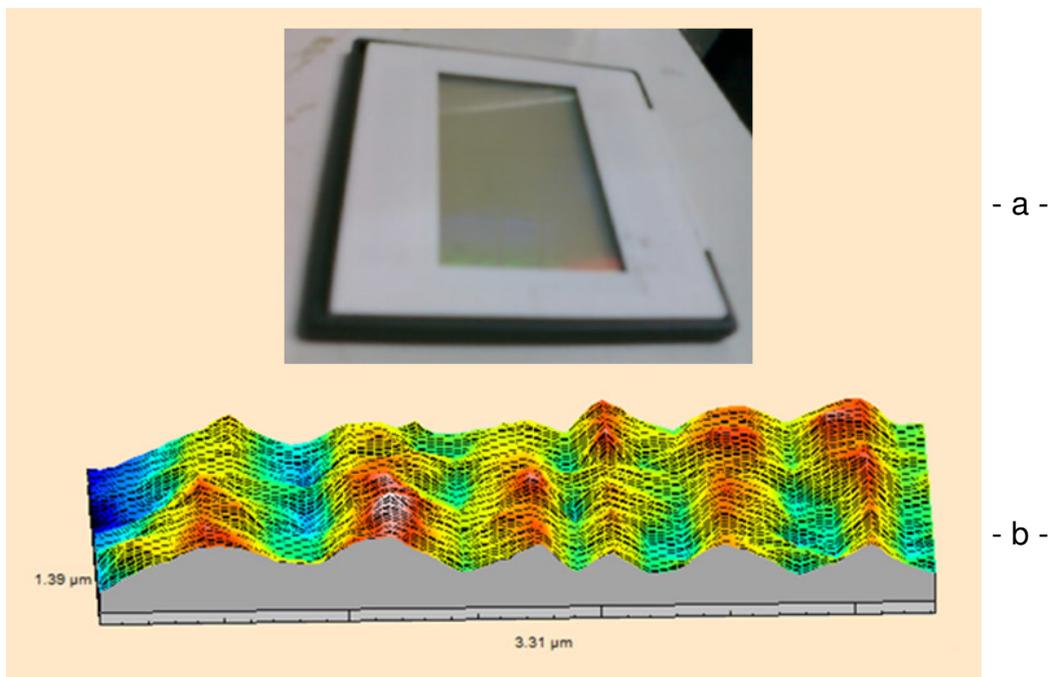


Figura 3.6 – Imagem da rede de difração gerada pelo microscópio confocal.

O AFM passa a ser utilizado nas comparações, pois trata-se de uma técnica com resolução cinquenta vezes maior que as técnicas ópticas utilizadas. Os resultados obtidos com estas amostras padrão possibilitaram comparações mais precisas que contribuíram para o aprimoramento do microscópio confocal, em particular dos estudos referentes aos cálculos utilizados na determinação do fundo de escala vertical.

A Figura 58 mostra as imagens dos padrões submicrométricos utilizados nas comparações as três técnicas topográficas. Pela Figura 3.7.a visualiza-se a amostra contendo bolsos com diâmetro $3,5 \mu\text{m}$. O segundo padrão contém trilhas de $3,0 \mu\text{m}$ de largura e $2,5 \mu\text{m}$ de espaçamento entre elas. (Figura 3.7.b)

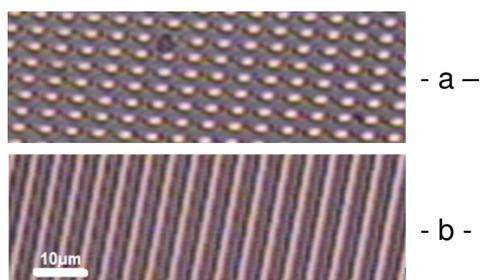


Figura 3.7 – Imagem das amostras padrão construída pelo microscópio simples montado na estrutura do microscópio confocal.

As amostras padrão demonstradas na Figura 3.7 são produzidas por processo de micro litografia e são constituídas por um substrato de silício (Si), parte clara da imagem, e estrutura de óxido de silício (SiO_2), parte escura da imagem.

Pela Figura 3.8 observa-se a imagem da amostra padrão contendo bolsos, gerada pelo microscópio de força atômica.

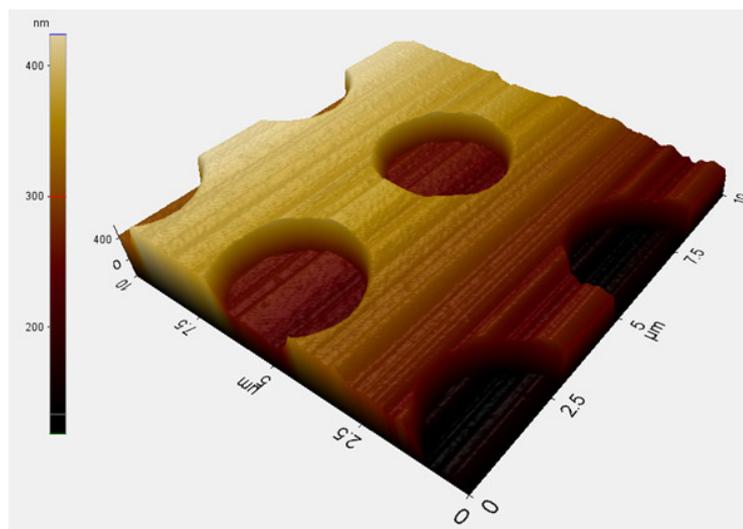


Figura 3.8 – Imagem gerada pelo AFM e visualizada através do software da *Park Systems*.

A Figura 3.9 mostra a imagem construída pelo AFM convertida pelo *software mountains Map*[®]. Esta imagem da superfície primária passou por processos de filtragem de forma e ondulação com a finalidade de se obter uma superfície ideal para se realizar as comparações entre as técnicas de IL e MCVL. (Figuras 3.10 e 3.11)

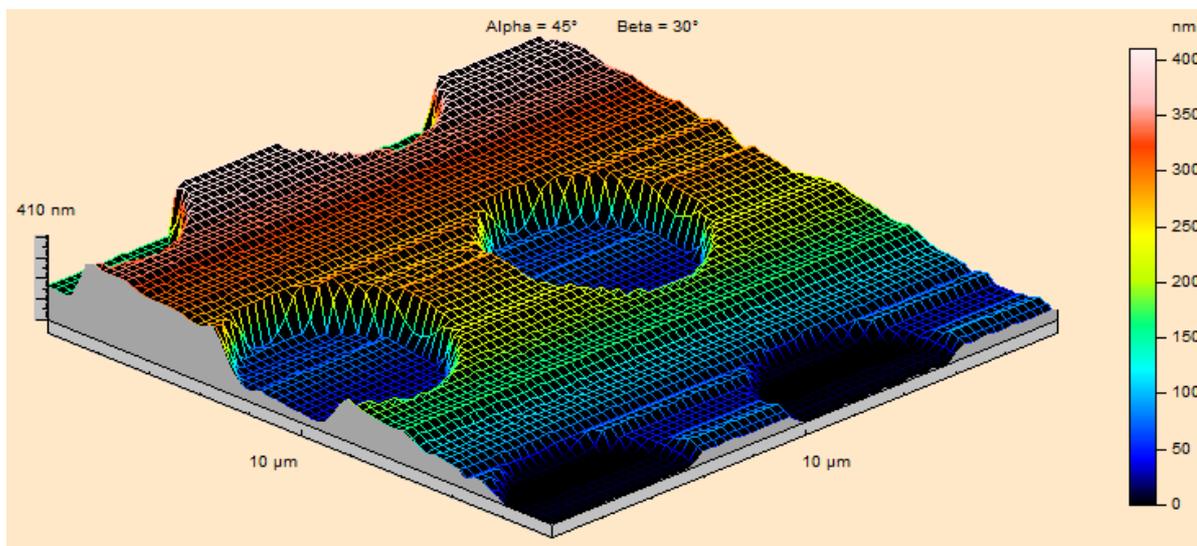


Figura 3.9 – Superfície primária gerada AFM e pelo *software Mountains Map*.

Para se determinar este desvio de forma utilizou-se filtro polinomial de ordem 2, a Figura 3.10 demonstra as superfícies resultantes da aplicação deste filtro.

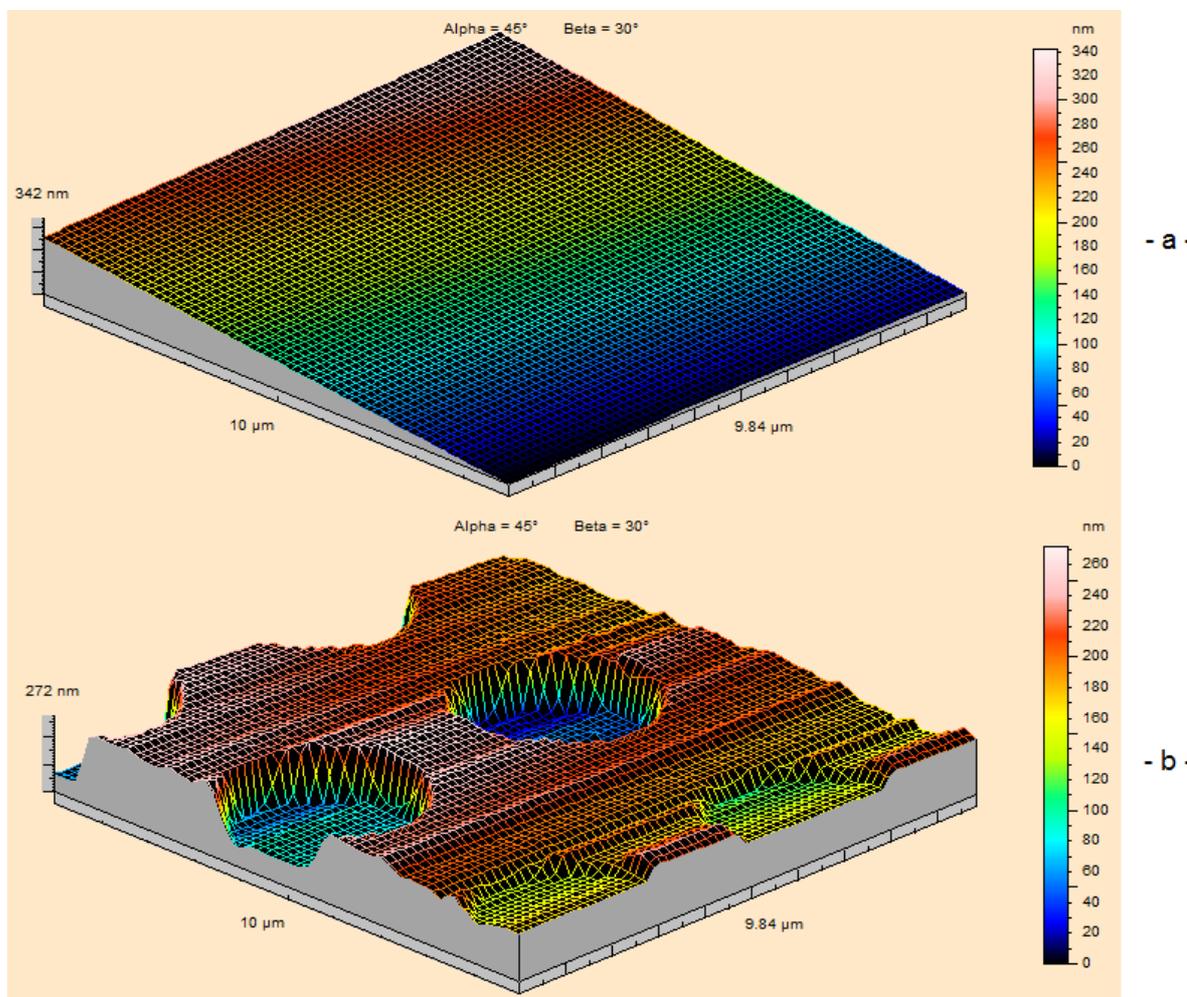


Figura 3.10 – Imagem resultante da aplicação do filtro polinomial.

Pela Figura 3.10.a, observa-se a inclinação subtraída da superfície primária, que pode estar relacionada à fixação da amostra no microscópio, pois se observa que mesmo aplicando um filtro de ordem 2 a imagem possui aspecto planar, indicando um desvio de forma de ordem 1, este desvio de forma também pode ser inerente da própria mostra. Para evitar dúvidas como esta ao se comparar as técnicas, todas as imagens geradas para este trabalho foram submetidas aos mesmos processos de filtragem.

Posteriormente a aplicação do filtro polinomial, foi aplicada sobre a imagem da Figura 3.10.b um filtro passa baixo, para se separar a ondulação contida na imagem da rugosidade. Para isto, aplicou-se filtro gaussiano com *cut-off* de 800 nm, separando assim comprimentos de onda superiores a esta faixa. (Figura 3.11)

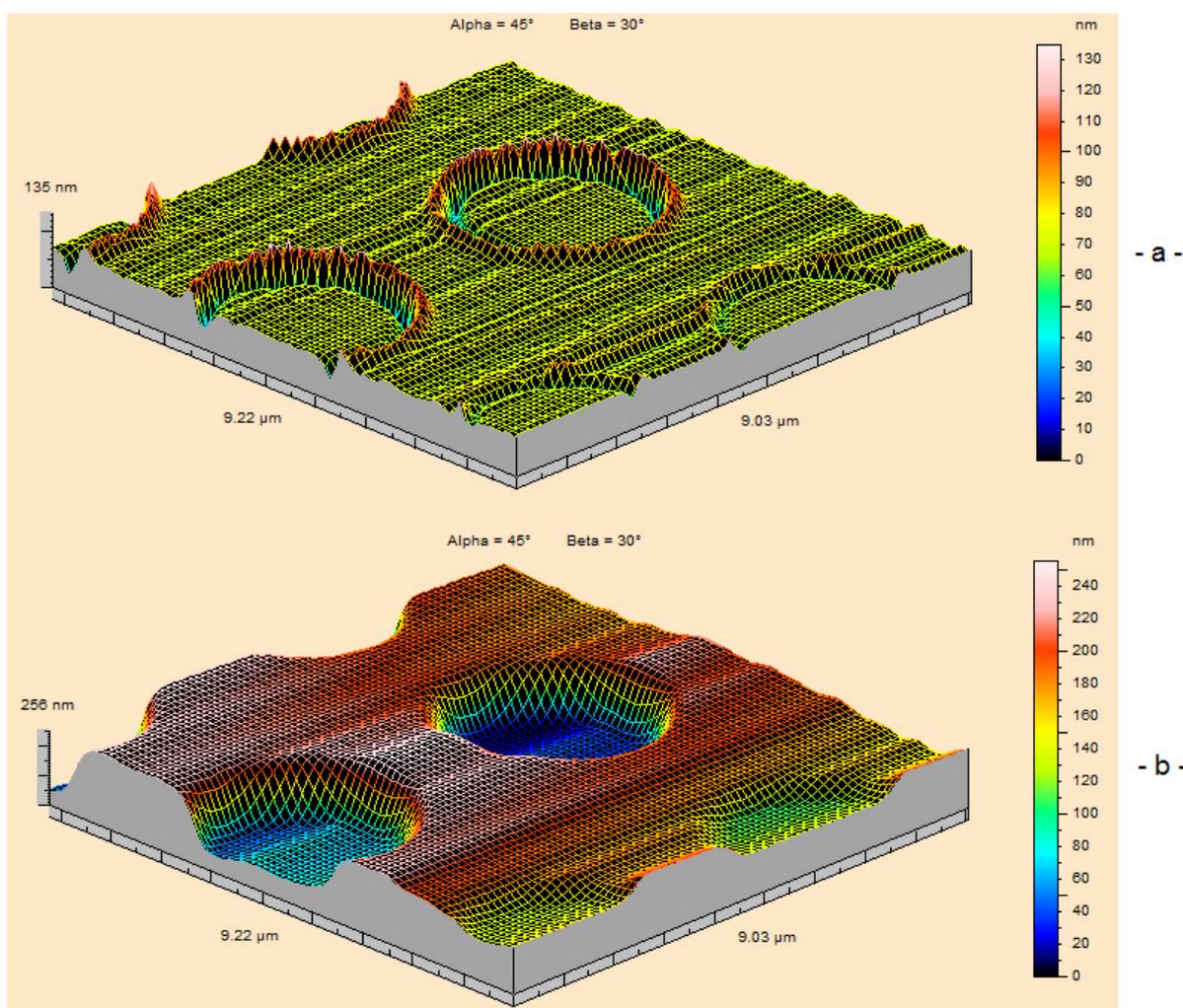


Figura 3.11 – Resultados da aplicação de filtro de gaussiano de *cut-off* igual à 800nm.

A Figura 3.11.a representa a rugosidade presente na superfície amostra, já a Figura 3.11.b representa a imagem da ondulação contida na mesma, ou seja, uma imagem contendo comprimentos de onda acima de 800 nm.

A superfície que *carrega* os comprimentos acima de 800 nm possui as principais características da amostra padrão e por isto serão utilizadas nas comparações por meio de parâmetros topográficos.

Geradas as imagens pelo AFM utilizou-se o IL e o MCVL (Figura 3.12) para realizar as imagens das mesmas amostras padrão.

Para se determinar o valor do fundo de escala vertical para a imagem gerada pelo MCVL foram realizadas seis varreduras na mesma amostra, a Tabela 3.1 mostra os valores obtidos e calculados. O valor calculado para o fundo de escala para do eixo vertical para a amostra contendo bolsos é de 281 nm. A Figura 3.13 demonstra os resultados finais para a amostra contendo bolsos para as três técnicas.

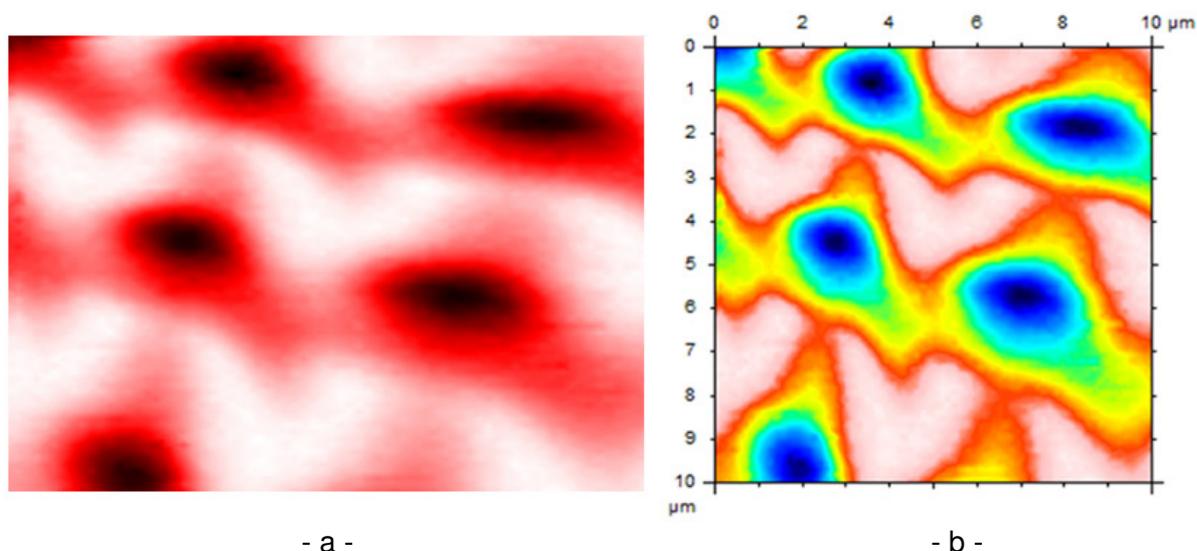


Figura 3.12 – Imagem da amostra padrão contendo bolsos gerada pelo microscópio confocal (a) e convertida para *software Mountains Map* (b).

Tabela 3.1 – Determinação do valor do fundo escala para o eixo vertical para a amostra contendo bolsos. (Valores de intensidade na forma de potência 10^4)

Superfícies	I_Max	I_Min	d _i	ΔI	ΔZ (μm)
SURACE_00	1,30	1,20	1,15	0,10	0,27
SURACE_01	1,25	1,00	1,10	0,25	0,72
SURACE_02	1,00	0,90	0,85	0,10	0,37
SURACE_03	1,00	0,95	0,85	0,05	0,19
SURACE_04	1,35	1,30	1,20	0,05	0,13
SURACE_05	1,25	1,15	1,10	0,10	0,28

Pelas imagens mostradas na Figura 3.13 verifica-se que os aspectos finais das imagens geradas pelo IL e pelo MCVL são consideravelmente diferentes das imagens obtidas pelo AFM, isto se deve a diferença da faixa de resolução entre os equipamentos. Para os equipamentos ópticos a resolução é da ordem de 400 nm, enquanto para o AFM a resolução é de 10nm. Porém, é possível realizar comparações dimensionais para imagens geradas pelas técnicas.

Em um primeiro momento, pode se interpretar que as imagens não representam a mesma amostra, pois foram varridas em posições diferentes, porém em uma análise mais detalhada, observando o padrão de forma dimensional, conclui-se sobre a equivalência de representatividade das três técnicas.

A Figura 3.14 mostra vistas superiores e cortes longitudinais dos bolsos, para as três técnicas topográficas.

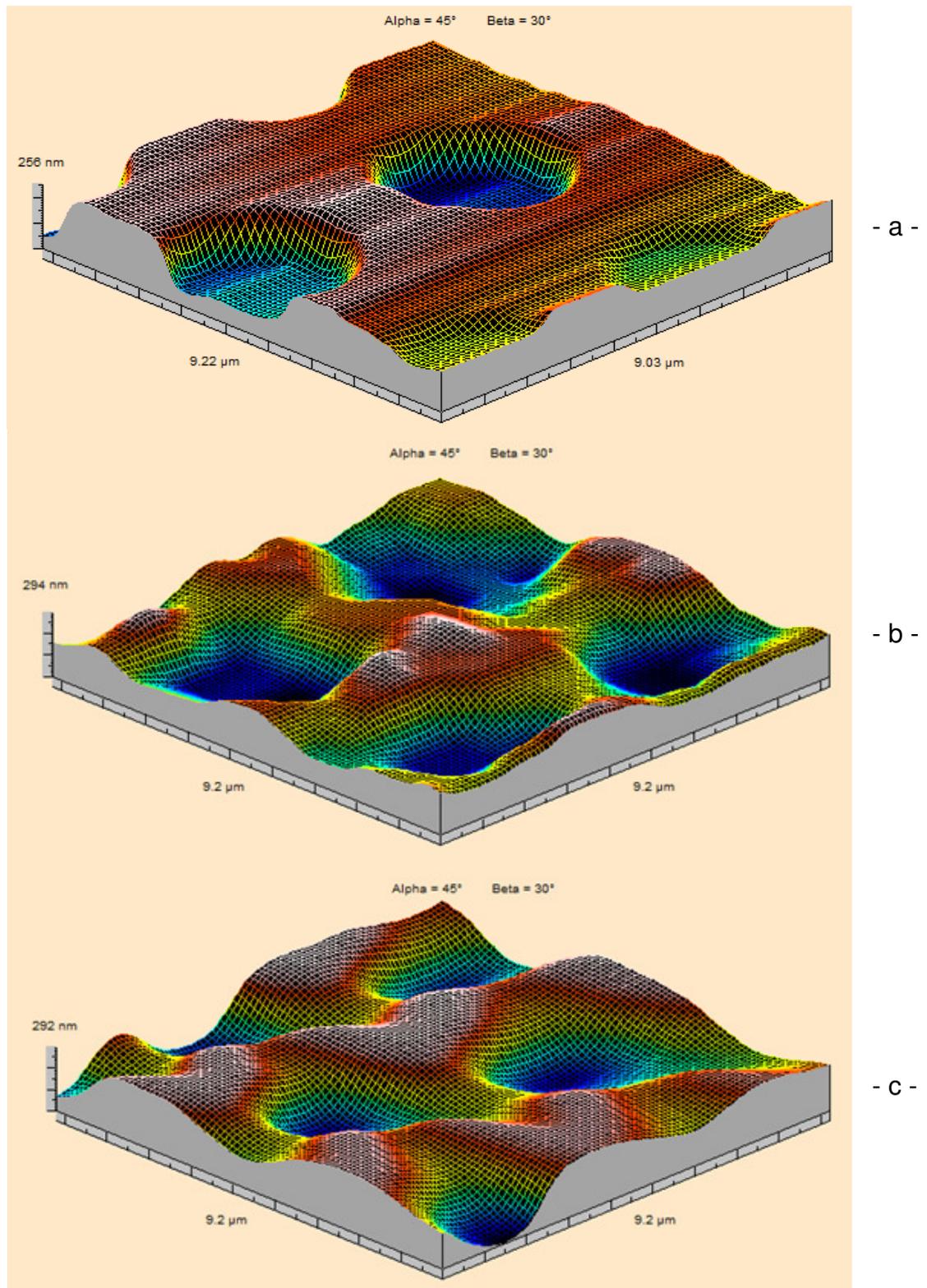


Figura 3.13 – Imagens da amostra padrão contendo bolsos. AFM (a), IL (b) e MCVL (c).

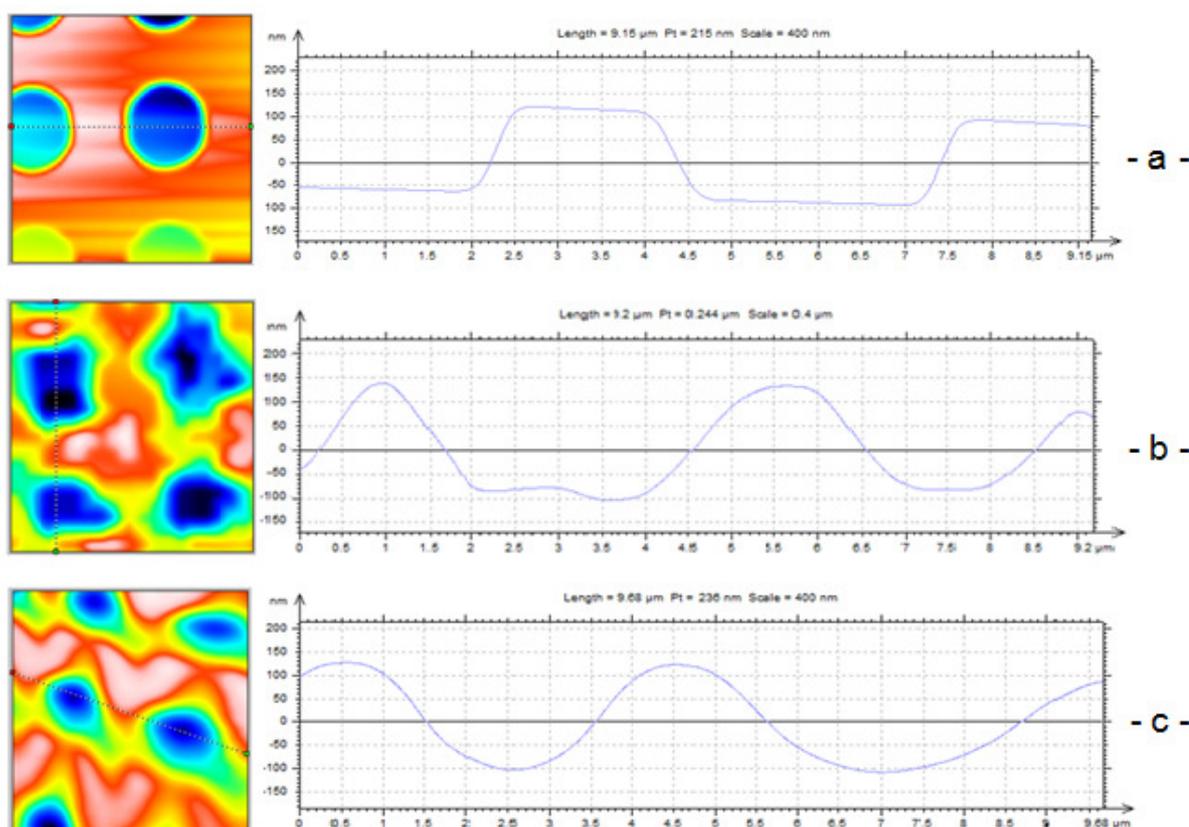


Figura 3.14 – Comparação por vista superior e perfil entre as três técnicas, amostra padrão bolsos em cortes de 10 μm . AFM (a), IL (b) e MCVL (c).

A imagem da Figura 3.14.a, construída pelo AFM, os bolsos possuem 3,5 μm de diâmetro. Para o perfil construído por interferometria (Figura 3.14.b), observa-se uma variação de 2 a 3,5 μm para os diâmetros dos bolsos.

Já a técnica confocal, mostrada na Figura 3.14.c, apesar do perfil com aspecto ondulado em comparação com o perfil construído pelo AFM, a representabilidade do diâmetro dos bolsos é compatível com o diâmetro real, onde seus valores então entre 3,0 e 4,0 μm .

O fenômeno de difração da luz está presente nas técnicas confocal e de interferometria, porém é mais acentuado nas imagens construídas pelo primeiro, pois o microscópio confocal utiliza-se do valor da intensidade para se referenciar e montar a matriz de dados, o interferômetro utiliza-se da diferença de fase entre as ondas originais e refletidas na amostra para se referenciar e o registro em sua matriz de dados é baseado no deslocamento do PZT que ajusta o foco sobre a amostra.

A Tabela 3.2 mostra os resultados obtidos para os parâmetros topográficos de amplitude, parâmetro híbrido e parâmetro funcional para a amostra contendo bolsos construídos pelas três técnicas.

Tabela 3.2 – Resultados dos parâmetros topográficos para amostra padrão contendo Bolsos. Comparação entre AFM, Interferometria e Confocal.

Parâmetro Topográfico	AFM	Interferometria	Confocal
Sq (nm)	59,9 ± 3,33	73,46 ± 4,73	72,50 ± 3,18
Sdq (μm/μm)	0,126 ± 0,007	0,139 ± 0,014	0,120 ± 0,008
Sbi	2,62 ± 0,02	1,35 ± 0,07	4,08 ± 0,09

O parâmetro topográfico de amplitude *Sq* informa que os desvios quadráticos médios das superfícies varridas pelas três técnicas topográficas possuem variação mínima. (Figura 3.15)

O resultado de uma Análise de Variância (ANOVA) fornece o valor estatístico para a variância entre as três técnicas para os parâmetros topográficos calculados. (Anexo I)

Com uma significância de 82% pode-se afirmar que não existe diferença entre os valores apresentados pelas técnicas de IL e MCVL para o parâmetro topográfico *Sq* na amostra contendo bolsos. Porém, com uma significância de 99% pode-se afirmar que existe diferença entre os resultados apresentados pelo AFM e as técnicas ópticas.

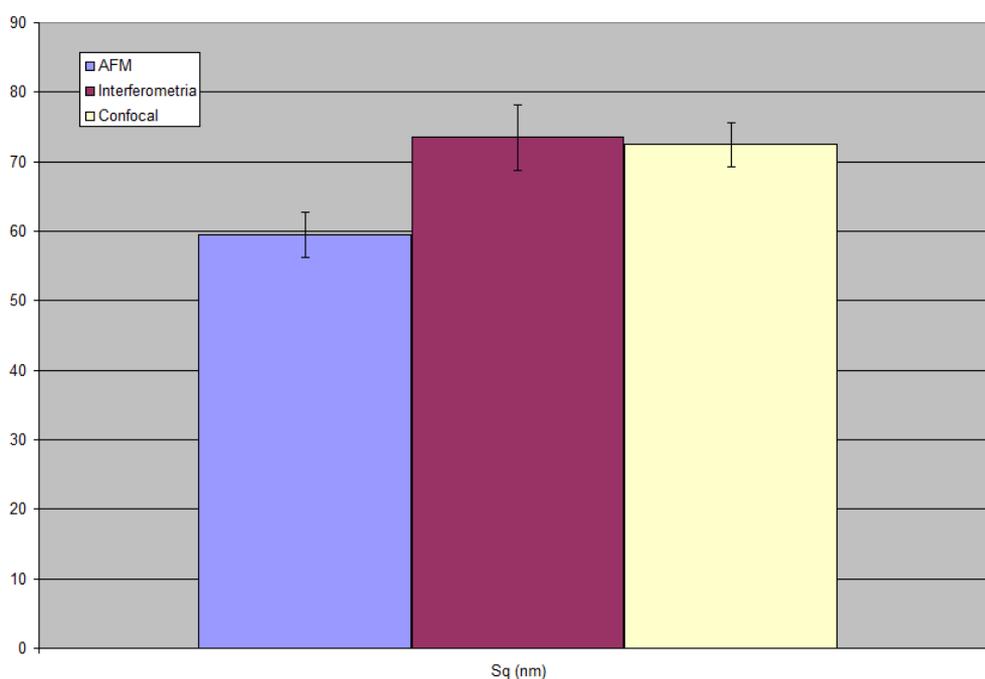


Figura 3.15 – Comparação entre as três técnicas pelo parâmetro topográfico de amplitude *Sq* para a amostra contendo bolsos.

O parâmetro híbrido *Sdq* informa o desvio quadrático médio para a inclinação da superfície. Pela Figura 3.16, pode-se visualizar que os valores deste parâmetro para as técnicas AFM, IL e MCVL estão dentro da faixa do desvio padrão. A variação observada

para o resultado mostrado para o MCVL pode ser explicada pela posição na qual foi realizada a varredura na amostra contendo bolsos, uma vez que esta apresenta um total de cinco bolsos, enquanto as outras duas técnicas apresentam áreas com um volume de quatro bolsos. Este fato pode ter influenciado o resultado do Sdq na técnica confocal, pois parâmetros híbridos estão fortemente relacionados com a variância das amplitudes com relação à área varrida. Com uma significância de 83% a análise de variância mostra que não há diferença significativa entre as técnicas para os resultados referentes ao parâmetro Sdq .

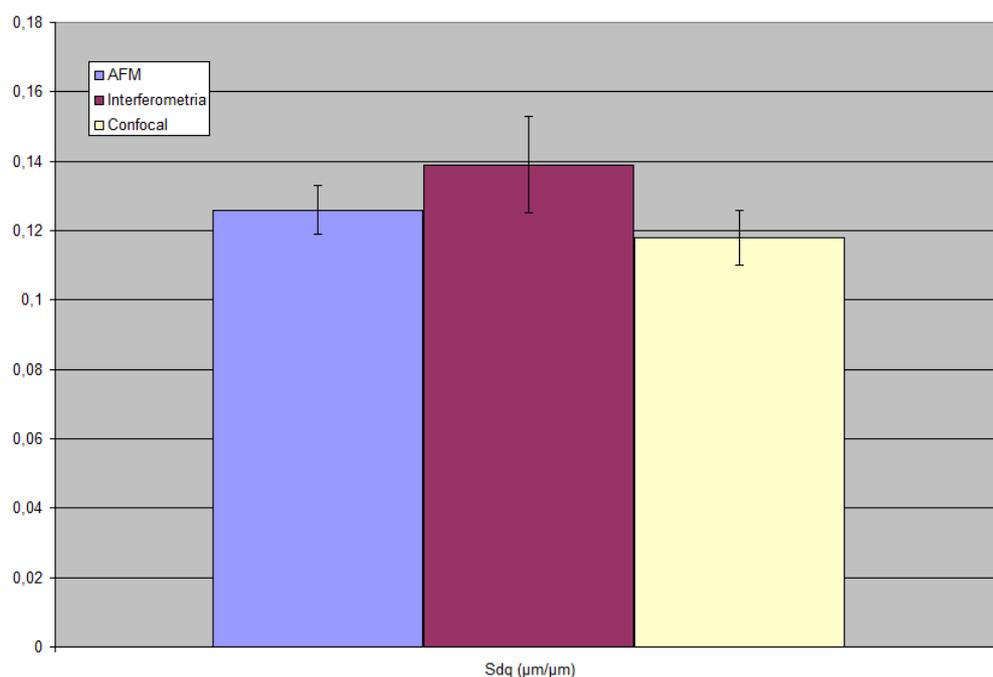


Figura 3.16 – Comparação entre as três técnicas pelo parâmetro topográfico híbrido (Sdq).

O parâmetro funcional possui importância relevante, pois descreve a informação necessária para se selecionar a função do elemento superfície em uma aplicação de engenharia.

Os resultados apresentam diferença consideráveis para este parâmetro. (Figura 3.17)

Os resultados para as técnicas AFM e IL apresentam diferença de 40% entre seus valores, que pode ser explicado pela capacidade de resolução entre as técnicas. A técnica confocal apresentou um valor 36% maior que o apresentado pelo AFM. Para se compreender os resultados apresentados para este parâmetro é necessário analisar a Figura 3.13, que demonstra em todas as suas imagens os pontos mais altos da topográfica na com branca e vermelha, verifica-se que a técnica confocal criou uma imagem com topografia mais uniforme, este efeito foi causado pela difração da luz na superfície da amostra foi preponderante na resposta dada pelo parâmetro Sbi para esta técnica.

Pela aplicação da ANOVA pode-se afirmar com 99% de confiança que os resultados para o parâmetro S_{bi} para as comparações entre as três técnicas não são compatíveis para a amostra contendo bolsdos.

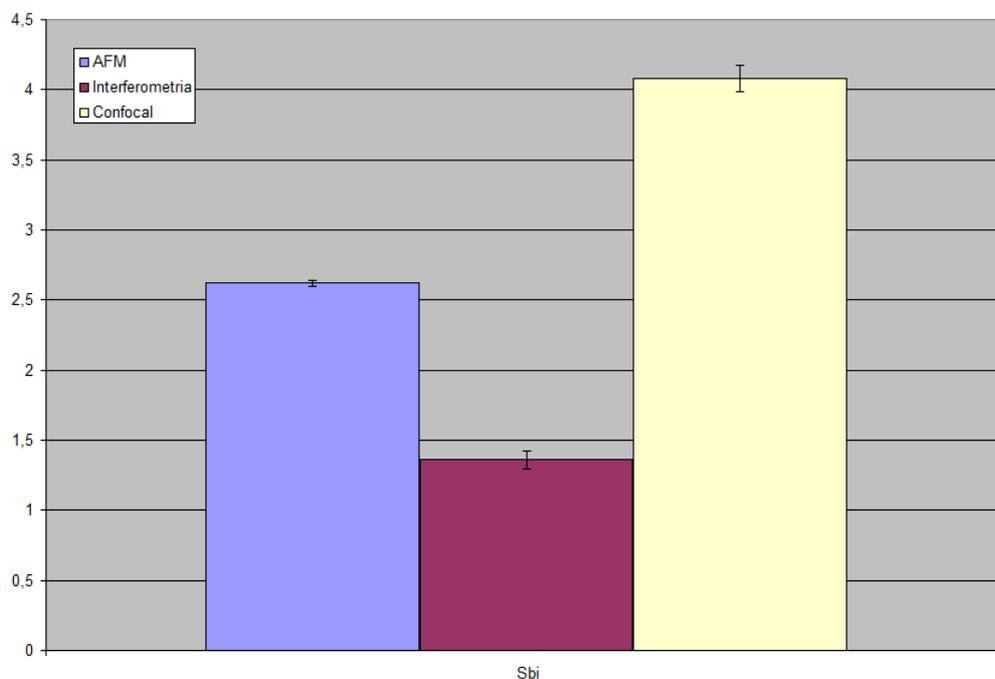


Figura 3.17 – Comparação entre as três técnicas pelo parâmetro funcional S_{bi} .

Para se concretizar as análises para as técnicas topográficas, foram realizados os mesmos ensaios e tratamentos de imagens para outra amostra submicrométrica. A Figura 3.18 mostra imagens geradas pelo microscópio confocal para a amostra padrão contendo trilhas.

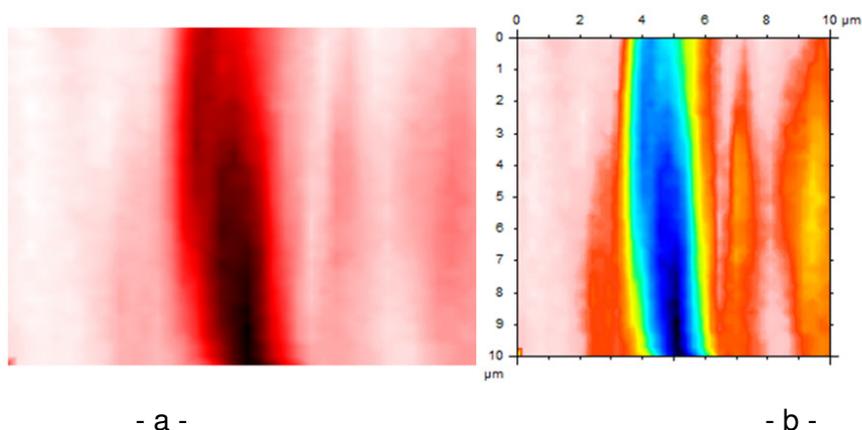


Figura 3.18 – Imagem da amostra padrão trilhas gerada pelo microscópio confocal (a) e convertida para pelo *software Mountains Map* (b).

A Figura 3.19 apresenta as imagens para as técnicas AFM, Interferometria e Confocal. Por estas imagens da amostra padrão contendo trilhas observa-se grande semelhança nos resultados obtidos pelas três técnicas topográficas. Por uma vista superior

da topográfica das superfícies (Figura 3.20) observam-se trilhas e vales por uma observação qualitativa e quantitativa.

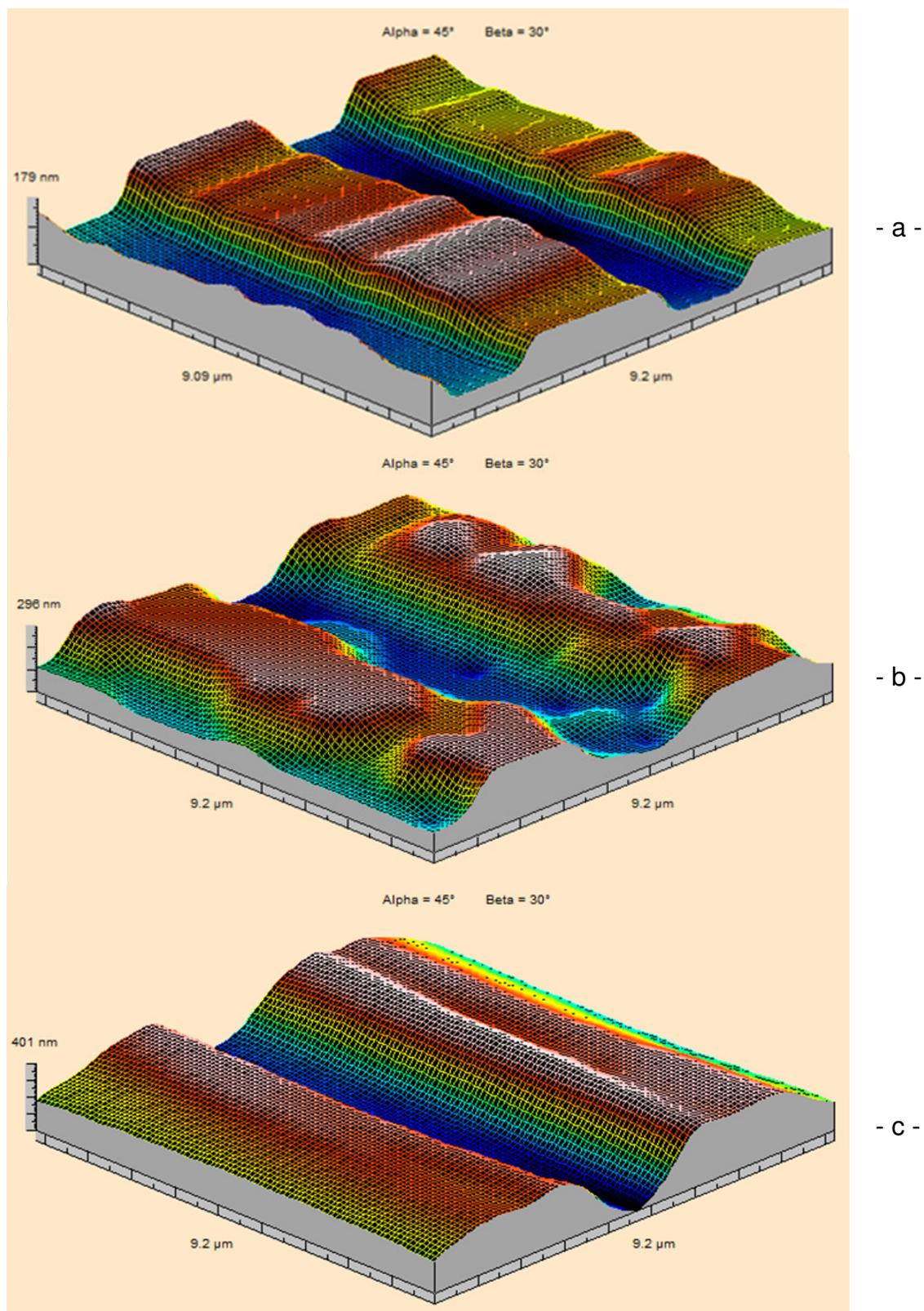


Figura 3.19 – Imagens da amostra padrão contendo trilhas geradas pelas três técnicas. AFM (a), IL (b) e MCVL (c).

Verifica-se pela Figura 3.20 que há correspondência entre os resultados obtidos. A largura das trilhas para as três técnicas possui valores próximos a $3,0\ \mu\text{m}$, vales com largura de aproximadamente $2,5\ \mu\text{m}$.

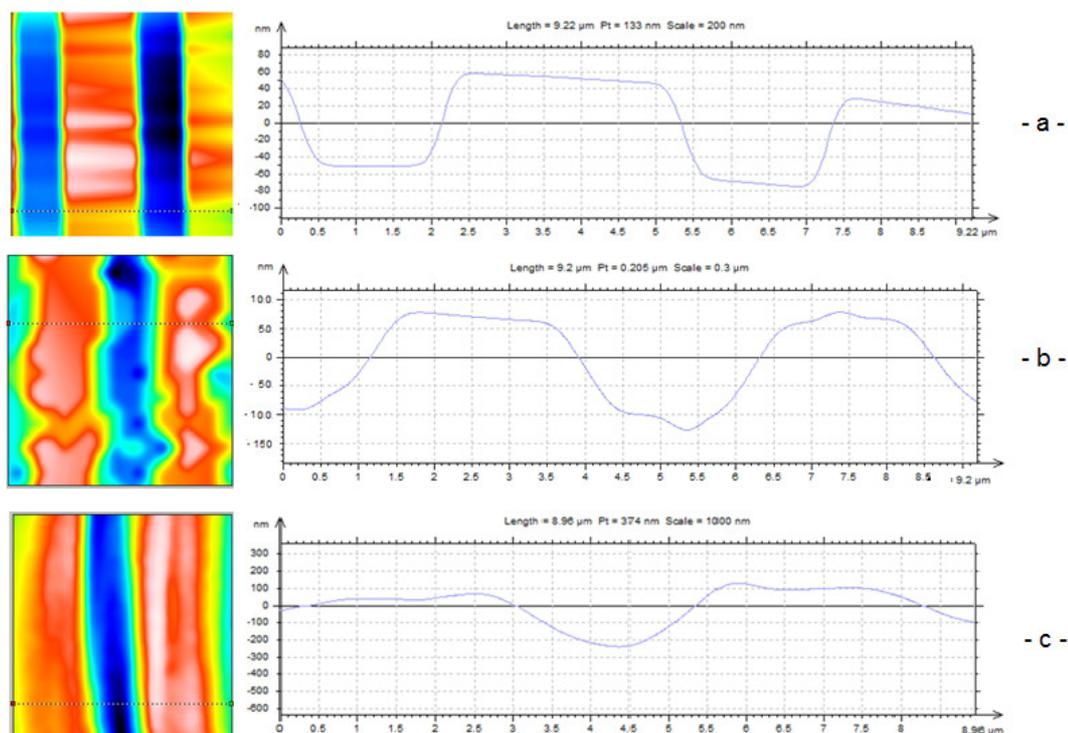


Figura 3.20 – Comparação por vista superior e perfil das três técnicas. AFM (a), IL (b) e MCVL (c).

Para comparações quantitativas das superfícies, foram utilizados os parâmetros topográficos expostos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Resultados dos parâmetros topográficos para amostra padrão contendo trilhas. Comparação entre AFM, Interferometria e Confocal

Parâmetro Topográfico	AFM	Interferometria	Confocal
Sq (nm)	$52,62 \pm 4,82$	$57,60 \pm 3,12$	$75,23 \pm 6,39$
Sdq ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$)	$0,109 \pm 0,006$	$0,104 \pm 0,012$	$0,122 \pm 0,011$
Sbi	$2,90 \pm 0,33$	$1,65 \pm 0,21$	$2,39 \pm 0,43$

Os valores para o parâmetro de amplitude Sq (Figura 3.21), mostraram comportamento semelhante entre os resultados apresentados pelo AFM e IL, o resultados gerado pelo microscópio confocal apresenta variação entre 12 e 41% acima dos valores apresentados pelas outras duas técnicas. A ANOVA aponta a identidade entre os resultados apresentados para AFM e IL com uma confiabilidade de 93% e uma diferença entre os

resultados apresentados por estas técnicas com relação ao resultado apresentado pelo MCVL com um nível de significância de 99%.

Assim como para o parâmetro de amplitude, os valores para os parâmetros híbridos, Figura 3.22, demonstram boa aproximação, porém com uma tendência do valor gerado pelo microscópio confocal, que apresentou valores entre 12 e 33% acima do valor apresentado pelas técnicas de AFM e IL, que por sua vez apresentaram resultados equivalentes com 94% de significância.

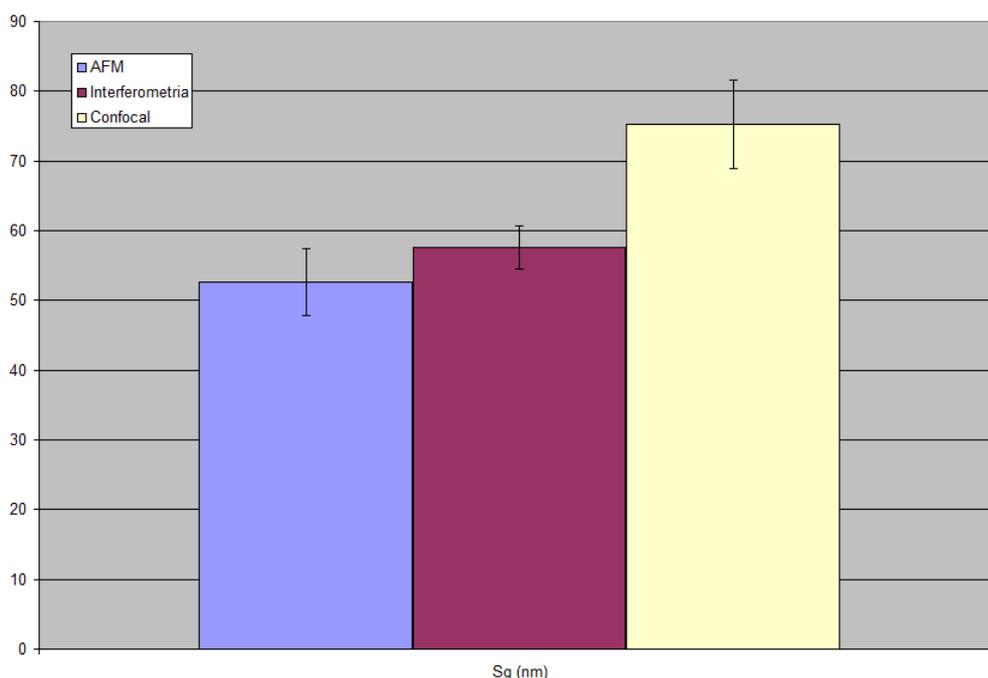


Figura 3.21 – Comparação entre as três técnicas pelos parâmetros topográficos de amplitude.

Os resultados para os parâmetros de amplitude e híbrido para o microscópio confocal tiveram seu valor influenciados pelo valor do fundo de escala calculado, $\Delta Z = 401$ nm. O valor do fundo de escala sofre influencia da difração da luz em uma direção específica, pois a geometria desta amostra propícia este fenômeno, conforme demonstrado na Figura 2.12.

A Figura 2.23 apresenta os resultados para o parâmetro funcional, o fenômeno de difração que influenciou os resultados dos parâmetros de amplitude e híbrido para esta amostra, não influenciou tanto os resultados para o parâmetro S_{bi} . A técnica confocal apresentou um valor intermediário entre os apresentados pelo AFM e pelo IL. Os resultados apresentados estão dentro das faixas de desvio padrão apresentadas para este parâmetro, porém não apresentam consistência estatísticas para aplicação da análise de variância.

Pelas imagens da Figura 3.19 observa-se a topografia das imagens geradas pelo AFM e pelo MCVL contém menos irregularidades, como ocorrido para a amostra contendo bolsos verifica-se que a técnica confocal criou uma imagem com topografia uniforme e que foi preponderante na resposta dada pelo parâmetro S_{bi} para esta técnica. (Figura 3.23)

Para a amostra contendo trilhas, a análise de variância mostra uma correlação entre as técnicas com significância de 60% para o parâmetro topográfico S_{bi} .

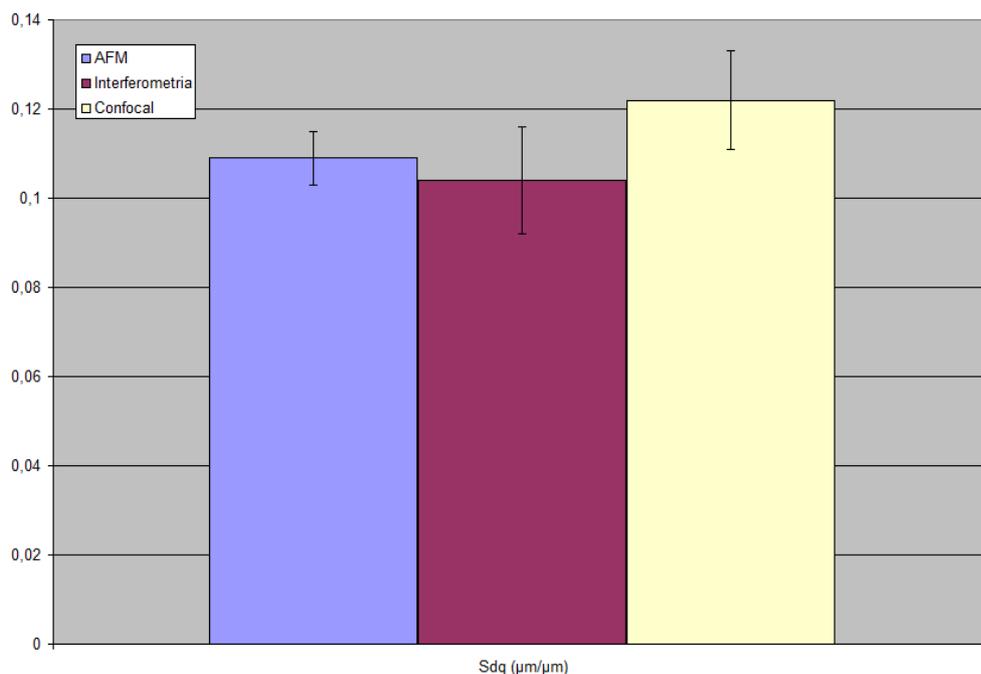


Figura 3.22 – Comparação entre as três técnicas pelos parâmetros topográficos de Híbrido.

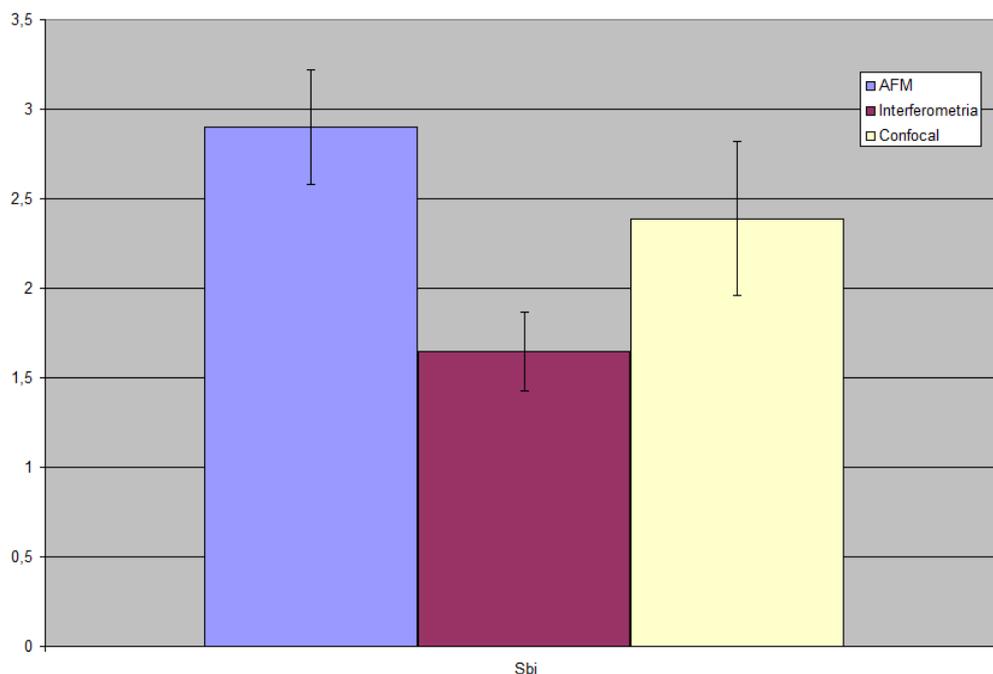


Figura 3.23 – Parâmetro funcional S_{bi} para a amostra contendo trilhas.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na primeira parte dos resultados, conclui-se pelas imagens geradas pelo MCVL desenvolvido obteve-se sucesso em seu objetivo de representar qualitativamente as superfícies das amostras.

As imagens geradas pelo MCVL são representativas e capazes de distinguir superfícies com acabamentos diferentes.

Pelos resultados qualitativos apresentados, conclui-se que as imagens geradas pelo microscópio confocal de varredura laser são compatíveis com as imagens geradas pelo interferômetro laser.

Pode-se afirmar que as técnicas ópticas, confocal e interferometria, encontram equivalência com as imagens geradas pelo microscópio de força atômica, equipamento com resolução cinquenta vezes maior que o limites de difração da luz.

Pelos resultados quantitativos, conclui-se que o equipamento desenvolvido é preciso em seus resultados referentes aos eixos horizontais e aceitáveis com relação aos resultados provindos de eixo vertical.

Os resultados para o fundo de escala do eixo Z e parâmetros topográficos relacionados a este eixo sofrem perturbação pelo fenômeno de difração da luz e pelo alinhamento do conjunto óptico, uma vez que seus valores são baseados na intensidade da luz refletida na superfície da amostra.

De forma geral, conclui-se que o equipamento de microscópio confocal de varredura laser desenvolvido é capaz de criar imagens confiáveis das superfícies de materiais opacos com resolução submicrométrica, uma vez que as amostras padrão empregadas nas investigações possui estruturas com alturas da ordem de um quarto de micrometro.

4.1 – Trabalhos Futuros

Como demonstrado na Tabela 1.1 a área de varredura do microscópio confocal pode chegar à ordem de 10^3 mm^2 (trasladação da amostra por meio de motor eletromecânico), porém o microscópio confocal desenvolvido neste trabalho o transladador é piezoelétrico, o que limita a sua área de varredura em 10^{-4} mm^2 , o próximo passo no desenvolvimento deste trabalho será a substituição do transladador *piezoelétrico* por um conjunto de atuadores eletromecânicos. (Figura 4.1)



Figura 4.1 – Posicionador Z825B – *Serie Motorized DC Servo Actuator* adquiridos e *apt – dc servo controller USB*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR ISO 4287 - Especificações geométricas do produto (GPS) - **Rugosidade: Método do perfil - Termos, definições e parâmetros da rugosidade**. 2002

AMOS, W. B.; WHITE, J. G. How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research, **Biology of the Cell**, v. 95, p. 335-342, 2003.

BRAKENHOFF, G. J.; BLOM, P.; BARENDT P. Confocal Scanning Light Microscopy with High Aperture Immersion Lenses, **Journal of Microscopy**, v. 117, p. 219-232, 1979.

DE MELLO, J. D. B., STRAIOTO, F. G., LELIS, B. C., SOARES, C. J., DECHICHI, P., FERNANDES NETO, A. J., **Estudo Comparativo da Topografia De Superfície do Esmalte Humano e Bovino**. Revista de Pós-Graduação (USP) 13: 223-228., 2006

DONG, W. P.; SULLIVAN, P. J.; STOUT, K. J. Comprehensive study of parameters for characterizing three-dimensional surface topography, **Wear**. v. 178, p. 29-43, 1994.

EGGER, M. D.; PETRAN, M. New Reflected-Light Microscope for Viewing Unstained Brain and Ganglion Cells, **Science**, v. 157, p. 305-307, 1967.

EGNER, A.; ANDRESEN, V.; HELL, S. W.; Comparison of the axial resolution of practical Nipkow-disk confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: theory and experiment, **Journal of Microscopy**, v. 206, p. 24–32, 2002.

FEYNMAN, R. P.; LEIGHTON, R. B.; SANDS, M. **The Feynman Lectures on Physics**, 6.ed. N.Y.; Addison-Wesley Publishing, 1977.

GU M. Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes, **World Scientific**, New Jersey, 1996.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER J., **Fundamentals of Physics 4**. 6.ed. N.Y.: John & Wiley & Sons, 2001. 299p.

NEWTON, I.; *Óptica*, 1 ed. EDUSP, Sao Paulo, S.P., 304p., 2002.

HAMILTON D. K.; WILSON T., **Scanning Optical Microscopy by Objective Lens Scanning**, Journal of Physics E: Scientific Instruments, 19: 52-54, 1986.

HANLON, D. N.; Todd, I.; PEEKSTOK, E.; RAINFORTH, W. M.; VAN DER ZWAAG, S.; The application of laser scanning confocal microscopy to tribological research, *Wear*, V. 251, n. 12, p. 1159–1168, 2001.

ISO 11562 – Geometrical Product Specifications (GPS) – **Surface texture: Profile Method – Metrological characteristics of phase correct filters**;1997.

JACKSON J. D.; **Classical Electrodynamics**, N.Y., 3 ed – Wiley & Sons, 1999, 808p.

KLEIN, M.V.; FURTAK, T.E., **Optics**. 2.ed. N.Y.: Wiley, 1986. 660p.

MINSKY, M. Microscopy Apparatus, **US Pat. 3,013,467**, 1961.

MINSKY, M., **Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscopy**, v. 10, p. 128-138, 1988.

MONTE, A. F. G.; CRUZ, J. M. R.; MORAIS, P.C.; An experimental design for micro luminescence, **Rev. Sci. Instrument**, v. 68, p. 3890, 1997.

MUMMERY, L. Surface Texture Analysis: Thr Handbook. **Hommelwerke GmbH**, p. 106, 1992.

NATHAN, S. C.; FELLERS T. J.; DAVIDSON, M. W.; **Tutorial: Laser scanning confocal microscopy**, National High Magnetic Field Laboratory, Florida, 2009.

Norma DIN EN ISO 4287 - Geometrical Product Specifications (GPS) – **Surface texture: Profile method – Terms, definitions and surface texture parameters**. 1998

OLIVEIRA, A.R.F.; DE MELLO, J.D.B.; MONTE, A.F.G. **Desenvolvimento de Microscópio Confocal para Análise de Superfície**. 20ª POSMEC, PPGEM, UFU, 4p, 2010

OLIVEIRA, A.R.F.; DE MELLO, J.D.B.; MONTE, A.F.G., **Construction and analysis of surface images by using confocal laser scanning**, X Encontro da SBPMAT, R.S., 2011

Operator Manual UBSoft Version 1.9, **UBM MESSTECHNIK**. 1990

Operator Manual Park System - **AFM XE-70**, 2011.

PAWLEY, J. B., **Handbook of Biological Confocal Microscopy**, N.Y.: Plenum Press, 1995.

SHEPPARD C. J. R.; SHOTTON M., **Confocal Laser Scanning Microscopy**, Oxford, United Kingdom: BIOS Scientific Publishers, 1997.

SHEPPARD, C. J. R., WILSON T., **Effect of Spherical Aberration on the Imaging Properties of Scanning Optical Microscopes**, Applied Optics, 18: 1058, 1979.

Site nanoScience Instruments. **Atomic Force Microscopy**,
<www.nanoscience.com/education/AFM.htm>, **Acesso em 29 nov 2011**.

Site da Olympus – **Concepts in Confocal Microscopy** – Disponível em:
<<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/index.html>>, **Acesso em: 10 set. 2011**.

Site Thorlabs, Disponível em: <<http://www.thorlabs.com>>. **Acesso em: 22 jan. 2011**.

Site da Mitutoyo Sul Americana, Disponível em: <<http://www.mitutoyo.com.br>>. **Acesso em: 01 dez. 2011**.

Site Zeiss, **Tutorial: Education in Microscopy and Digital Imaging**, Disponível em:
<<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/referencelibrary/laserconfocal.html>>. **Acesso em: 21 set. 2011**.

Site Zeiss, **Image Formation**, Disponível em:

<<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/imageformation.html>>. **Acesso em: 21 set. 2011.**

TOY, D. A.; Confocal Microscopy: The Ups and Downs of 3-D Profiling, **Semiconductor International**, V. 13, n. 5, p. 120-123, 1990.

WILHELM, S.; GRÖBLER, B.; GLUCH, M.; HEINZ, H., **Confocal laser scanning microscopy principles**. ZEISS Jena, 2010.

ANEXO I

A Análise de Variância (ANOVA) é um procedimento utilizado para comparar três ou mais tratamentos. Existem muitas variações da ANOVA devido aos diferentes tipos de experimentos que podem ser realizados. Nesse trabalho foi analisada a variância com um fator.

A análise de variância baseia-se na decomposição da variação total da variável resposta em partes que podem ser atribuídas aos tratamentos e ao erro experimental. Por esses motivos, os pressupostos da ANOVA devem ser testados ou avaliados em qualquer análise.

Se $F > F_{crítico}$, rejeitamos a hipótese de nulidade (H_0), ou seja, existem evidências de diferença significativa entre pelo menos um par de médias de tratamentos, ao nível α de significância escolhido. Caso contrário, não se rejeita a H_0 , ou seja, não há evidências de diferença significativa entre tratamentos, ao nível α de significância escolhido.

Outra maneira de avaliar a significância da estatística F é utilizando o valor- P . Se o valor- $P < \alpha$, rejeita-se a hipótese de nulidade. Caso contrário, não se rejeita a hipótese de nulidade, ou seja, não há evidências de diferenças significativas entre os tratamentos, ao nível α de significância escolhido.

Tabela AI.1 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos Sq para amostra padrão contendo bolsos. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	452,40	2	226,20	13,85	0,0056	5,14
Dentro dos grupos	97,99	6	16,33			
Total	550,39	8				

Tabela AI.2 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos Sdq para amostra padrão contendo bolsos. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,00064	2	0,0003	2,42	0,17	5,14
Dentro dos grupos	0,00079	6	0,0001			
Total	0,00143	8				

Tabela AI.3 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos Sbi para amostra padrão contendo bolsos. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	13,93	2	6,963	1019,36	2,52E-08	5,14
Dentro dos grupos	0,041	6	0,006			
Total	13,97	8				

Tabela AI.4 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos Sq para amostra padrão contendo trilhas. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	919,41	2	459,7	17,16	0,0033	5,14
Dentro dos grupos	160,73	6	26,7			
Total	1080,1	8				

Tabela AI.5 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos Sdq para amostra padrão contendo trilhas. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0009	2	0,0004	5,06	0,06	5,14
Dentro dos grupos	0,0005	6	8E-05			
Total	0,0014	8				

Tabela AI.6 – ANOVA para os resultados dos parâmetros topográficos Sbi para amostra padrão contendo trilhas. Comparação entre Interferometria, AFM e Confocal

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,92	2	1,46	1,04	0,41	5,14
Dentro dos grupos	8,39	6	1,40			
Total	11,31	8				