

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – PIBIC

MICROSCÓPIO DE INTERFEROMETRIA PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE AMOSTRAS EM CRIOTOMOGRAFIA DE RAIOS X: CONSTRUÇÃO DO SETUP E DESENVOLVIMENTO DO PIPELINE DE ANÁLISE DE IMAGENS

Pesquisador(a) responsável: Dr. Renan Ramalho Gerales

Unidade do CNPEM: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

1. Introdução

A criotomografia de raios-X moles (*cryoSXT – Cryo-soft X-ray tomography*) tornou-se uma das principais técnicas para a caracterização morfológica de células únicas em resolução nanométrica [1]. As células são preparadas em grids metálicas de microscopia eletrônica, que na sequência são submetidas ao congelamento ultrarrápido da solução aquosa em sistemas de vitrificação apropriados.

Controlar e verificar a espessura do gelo vítreo nas grids de microscopia eletrônica é, atualmente, um gargalo no *pipeline* de *cryoSXT*. A interferometria óptica de filme fino (*thin-film interference*) representa uma alternativa promissora para esse procedimento: ao iluminar o grid com luz de comprimento de onda conhecido em incidência normal, os padrões de interferência formados entre as interfaces ar–gelo e gelo–substrato carregam informação direta sobre a espessura da camada [2, 3, 4].

Trabalhos recentes demonstraram a viabilidade de sistemas de bancada baseados nesse princípio, desde plataformas totalmente automatizadas como o EasyGrid [5] e o VitroJet [6] até setups de baixo custo como o descrito por Hohle et al. [2]. Em paralelo, métodos de aprendizado de máquina — em especial redes neurais generativas (*pix2pix*) treinadas com dados sintéticos — mostraram-se capazes de traduzir imagens de cor de interferência em mapas quantitativos de espessura [4], contornando a ambiguidade inerente à relação sinusoidal entre intensidade e espessura. O presente projeto propõe a construção de um interferômetro óptico criogênico de bancada no CNPEM, integrando um setup óptico inspirado nos artigos de referência com um pipeline de software em Python para aquisição, processamento e classificação automática da qualidade dos grids.

2. Estado da Arte

Cinco artigos de referência serviram de base para o design do protótipo proposto neste projeto:

O **EasyGrid** [5] (EMBL, 2024) é uma plataforma modular e totalmente automatizada que combina robótica cartesiana de três eixos, vitrificação por jato de etano e microscopia

holográfica digital (DHM) num único instrumento. O módulo de controle de qualidade (EGC) usa um laser para gerar hologramas que, após reconstrução computacional, produzem mapas de espessura abaixo do comprimento de onda. A resolução de $0,6 \mu\text{m}/\text{pixel}$ a $10\times$ permite avaliar a distribuição de gelo em grids inteiros. Embora de alto custo (atualmente estimado em mais de 1 milhão de euros), o EasyGrid estabelece o estado da arte em automação e constitui a referência conceitual para os módulos de manipulação e armazenamento criogênico.

Hohle et al. [2] (Gene Center Munich, 2022) descrevem o sistema mais próximo do protótipo desejado: um microscópio de campo amplo adaptado para reflexão, com estágio criogênico customizado de alumínio imerso em LN_2 , objetivas secas de longa distância de trabalho (LWD, $10\times/\text{NA } 0,3$) e fonte de luz branca com filtro passa-banda multibanda para iluminação simultânea em três comprimentos de onda. A classificação automática é feita pela rede Darknet19, que atingiu 98% de precisão em cinco classes de qualidade. O procedimento completo de triagem de um grid-box (4 grids) leva menos de 15 minutos.

O **MeasureIce** [3] (Universidade de Melbourne, 2022) não usa interferometria óptica, mas sim espalhamento limitado por abertura (ALS) do feixe de elétrons de um microscópio eletrônico de transmissão (TEM – *Transmission Electron Microscope*), descrito pela equação de Beer-Lambert adaptada. Sua relevância para este projeto é como padrão-ouro de validação: as medições de espessura obtidas pelo interferômetro óptico serão calibradas por correlação com o MeasureIce nas instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), no CNPEM.

Last et al. [4] (Leiden University Medical Center, 2023) apresentam a referência técnica mais completa para o hardware do protótipo: objetiva Nikon CFI TU Plan Apo $100\times/\text{NA } 0,9$, LED multicanal LedHUB (Omicron GmbH) com picos em 405, 470 e 528 nm (FWHM 6, 9 e 15 nm por filtros Semrock), câmera sCMOS pco.edge 4.2, estágio criogênico Linkam CSM196v3 e espelho dicróico Chroma. O modelo de refletividade

$$r(d, \lambda) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cdot e^{-d/L} \cdot \cos\left(\frac{4\pi n_2 d}{\lambda} + \pi\right)$$

com $n_2 = 1,25$ e $L = 1 \mu\text{m}$ embasa a geração de dados sintéticos para o treinamento da rede pix2pix, que atingiu erro médio de $7,4 \pm 38 \text{ nm}$ na faixa 0–300 nm de espessura de gelo (relevante para cryoEM).

O **VitroJet** [6] (CryoSol-World, 2024) integra um sistema óptico de interferência ao seu dispositivo de deposição por pin-printing. A medição ocorre antes da vitrificação, com a amostra líquida a 4°C , simplificando a óptica pois elimina os desafios criogênicos na objetiva. A câmera Basler acA2440-20gm (20 fps) e a objetiva Mitutoyo (FOV $1,0\times 0,8 \text{ mm}$) capturam os padrões de interferência que são processados por um modelo óptico baseado na equação completa de refletância de Hecht. O sistema obtém erro de $\pm 20 \text{ nm}$ na faixa 0–70 nm, com desvio padrão reprodutível de $\pm 11 \text{ nm}$.

O conjunto desses trabalhos evidencia uma lacuna que o presente projeto visa preencher:

não existe ainda um sistema de baixo custo, totalmente aberto (código e hardware) e integrado a um pipeline de IA (inteligência artificial) validado, operando em condições criogênicas reais, adaptável ao fluxo de trabalho de cryoSXT, e que possa futuramente ser integrado à operação em ambientes de máxima contenção biológica, como será o caso do Orion no CNPEM e a linha de luz SIBIPURUNA, em particular.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Construir e validar um interferômetro óptico criogênico de bancada para medição e classificação automática da espessura de gelo vítreo em grids de microscopia eletrônica, integrando um setup óptico acessível a um pipeline de software em Python com classificação por aprendizado de máquina.

3.2 Objetivos Específicos

- Montar e caracterizar o setup óptico de interferometria por reflexão: fonte de luz multicanal (405/470/528 nm), objetiva LWD seca, divisor de feixe 50/50 e câmera de cor sensível ou sCMOS;
- Projetar e construir o estágio criogênico customizado para manutenção dos grids em LN₂ durante a observação;
- Desenvolver o pipeline de processamento de imagens em Python: aquisição, correção de background normalizada pela intensidade local do carbono, extração de mapa de cores RGB de interferência e estimativa de espessura via modelo físico de refletividade;
- Implementar e treinar um classificador de qualidade de grid com dados sintéticos gerados pelo modelo de refletividade (ruído de Perlin), nas cinco classes definidas por Hohle et al. [2]: *bad, too thin, optimal, thicker, too thick*;
- Validar as medições de espessura por correlação com o MeasureIce [3] no TEM do LNNano, no CNPEM (método do canal de gelo, $\pm 30^\circ$);
- Disponibilizar o código-fonte e a documentação do sistema em repositório aberto (GitHub), com compatibilidade de saída para o cryoSXT da estação experimental da linha de luz SIBIPURUNA no Sirius/Orion.

4. Metodologia

4.1 Construção do Setup Óptico

O sistema óptico será construído com base no design de Hohle et al. [2] e Last et al. [4]. A fonte de iluminação será composta por lasers com comprimentos de onda de 405 nm, 470 nm e 528 nm, e filtros de excitação ($\text{FWHM} \leq 15 \text{ nm}$) para garantir coerência temporal suficiente para a interferência de filme fino. A iluminação será direcionada à amostra em incidência normal

(configuração de Köhler) por um divisor de feixe 50/50, e a luz refletida será capturada por uma objetiva seca de longa distância de trabalho (LWD, $10\times/NA\ 0,3$ em primeira iteração) e registrada numa câmera de cor sensível ou sCMOS. A objetiva LWD é escolhida especificamente para operar acima do recipiente criogênico sem risco de condensação [2].

4.2 Estágio Criogênico

O estágio criogênico será construído a partir de um portador com alta inércia térmica, imerso em nitrogênio líquido (LN_2), seguindo a abordagem de baixo custo descrita por Hohle et al. [2]. O design priorizará a compatibilidade com os boxes padrão de cryoSXT do CNPEM e a estabilidade mecânica para evitar drift durante a aquisição. Um fluxo de N_2 gasoso seco sobre a objetiva será implementado para prevenir a formação de gelo parasita nas lentes.

4.3 Pipeline de Software e Processamento de Imagens

O pipeline de análise será desenvolvido em Python e organizado nos seguintes módulos: (i) aquisição e controle da câmera; (ii) detecção automática dos furos do grid pelo algoritmo de Transformada de Hough [6]; (iii) correção de background normalizada pela intensidade local do carbono ao redor de cada furo [6]; (iv) extração da intensidade média por canal de cor (R/G/B); e (v) estimativa de espessura pelo modelo de refletividade de película fina [4]:

$$r(d, \lambda) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cdot e^{-d/L} \cdot \cos\left(\frac{4\pi n_2 d}{\lambda} + \pi\right)$$

onde d é a espessura, λ o comprimento de onda, $n_2 = 1,25$ o índice de refração do gelo vítreo a 77 K e $L = 1\ \mu\text{m}$ o comprimento de coerência efetivo [4]. A refletividade efetiva será calculada integrando sobre o espectro da fonte, incorporando a transmissão dos filtros e a sensibilidade espectral da câmera.

4.4 Modelo de Aprendizado de Máquina

Um classificador de cinco classes de qualidade (*bad*, *too thin*, *optimal*, *thicker*, *too thick*) será treinado com dados sintéticos gerados pelo modelo físico acima, seguindo a estratégia de Last et al. [4]: pares de imagens (mapa de espessura + reflexão simulada) são produzidos a partir de mapas aleatórios com ruído de Perlin, cobrindo a faixa de espessura de 0 a 300 nm. O modelo será baseado na arquitetura pix2pix (cGAN) [4] ou, em primeira iteração, na rede Darknet19 de Hohle et al. [2] (software disponível em <https://github.com/GeneCenterMunich/ANNICAS>). O treinamento será conduzido em Python com TensorFlow/Keras, utilizando como referência o repositório de Last et al. [4] (em <https://github.com/bionanopatterning/thicknessprediction>). A saída do sistema será um mapa 2D de espessura e um rótulo de qualidade por *grid square*.

4.5 Validação

A validação será realizada em duas etapas. Na primeira, grids de referência com filmes de SiO_2 ou de carbono, com espessura conhecida, serão usadas para calibração do setup óptico. Na segunda, grids de microscopia eletrônica convencionais serão preparadas com amostras modelo (apoferritina equina ou ribossomos de levedura) e as espessuras obtidas pelo interferômetro serão comparadas com medições independentes pelo método ALS do MeasureIce [3] no TEM do LNNano. O critério de aceitação adotado será um erro médio de 7,4 nm com desvio padrão de 38 nm na faixa 0–300 nm, alinhado com o desempenho reportado por Last et al. [4].

4.6 Integração e Disponibilização

Ao final do projeto, o sistema completo — hardware documentado e código-fonte — será disponibilizado em repositório público no GitHub com licença aberta. A saída do software será compatível com os formatos de aquisição do microscópio criogênico de raios-X moles da estação experimental da linha de luz SIBIPIRUNA no Sirius/Orion, permitindo a exportação de coordenadas de regiões ótimas da grid diretamente para a sessão de controle do equipamento.

5. Cronograma de Atividades

Mês	Atividades
1–2	Levantamento e aquisição dos componentes ópticos; revisão aprofundada dos artigos de referência e planejamento detalhado; configuração do ambiente de desenvolvimento Python.
3–4	Montagem e alinhamento do setup óptico (fonte, divisor de feixe, câmera); construção do estágio criogênico; primeiros testes de interferência com filmes de SiO_2 ou de carbono.
5–6	Desenvolvimento do módulo de aquisição e controle da câmera; implementação da detecção de furos (Transformada de Hough); validação do setup óptico com amostras de calibração.
7–8	Desenvolvimento do módulo de correção de background; implementação do modelo de refletividade e mapa de espessura; geração do dataset sintético com ruído de Perlin.
9–10	Treinamento e avaliação do classificador de qualidade (pix2pix e/ou Darknet19); testes com grids reais de cryo-EM (apoferritina); validação cruzada com MeasureIce no TEM do LNNano.
11	Ajustes finos no pipeline completo; testes de integração com cryoSXT da SIBIPIRUNA; documentação do hardware e do código.
12	Análise estatística dos resultados de validação; publicação do repositório GitHub; preparação do relatório final e elaboração de manuscrito.

6. Referências Bibliográficas

- [1] Weinhardt V., Larabell C.A. *Soft X-Ray Tomography Has Evolved into a Powerful Tool for Revealing Cell Structures*. Annual Review of Analytical Chemistry 18, 2025. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071124-093849>
- [2] Hohle M.M., Lammens K., Gut F. et al. *Ice thickness monitoring for cryo-EM grids by interferometry imaging*. Scientific Reports 12, 15330, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16978-7>
- [3] Brown H.G., Hanssen E. *MeasureIce: accessible on-the-fly measurement of ice thickness in cryo-electron microscopy*. Communications Biology 5, 817, 2022. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03698-x>
- [4] Last M.G.F., Voortman L.M., Sharp T.H. *Measuring cryo-TEM sample thickness using reflected light microscopy and machine learning*. Journal of Structural Biology 215, 107965, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2023.107965>
- [5] Gemin O., Armijo V., Hons M. et al. *EasyGrid: a versatile platform for automated cryo-EM sample preparation and quality control*. bioRxiv, 2024. <https://doi.org/10.1101/2024.01.18.576170>
- [6] Henderikx R.J.M., Schotman M.J.G., Shahzad S. et al. *Ice thickness control and measurement in the VitroJet for time-efficient single particle structure determination*. Journal of Structural Biology 216, 108139, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2024.108139>