

MICROSCOPIA

MICROSCÓPIO - noções gerais

O olho humano tem poder de resolução de aproximadamente 0,1 mm ou 100 μm . Isto significa que se você olhar dois pontos separados por uma distância menor que 100 μm , esses pontos aparecerão como um ponto único. Para distinguir estruturas separadas uma das outras por menos de 100 μm , há necessidade de instrumentos ópticos que tenham poder de resolução aumentada. É importante salientar a diferença entre poder de resolução e poder de aumento. Se você ampliar várias vezes uma mesma fotografia comum, a imagem aumenta, mas os pontos separados por menos de 100 μm continuarão a aparecer como um ponto só, borrado. É possível, portanto, aumentar a ampliação, sem contudo melhorar a resolução. Os microscópios permitiram ao homem observar estruturas com ampliação maior e maior resolução.

O limite de resolução dos microscópios ópticos, que são aqueles que utilizam a luz para iluminar o objeto que está sendo analisado, é de cerca de 0,2 μm (ou 200 nm ou 2 000 A°); é melhor que o olho humano cerca de 500 vezes. Não se consegue construir microscópios ópticos com desempenho melhor que este, pois o fator limitante é o comprimento de onda da luz.

Com o advento do microscópio eletrônico, o poder de resolução foi aumentado cerca de 1000 vezes em relação ao microscópio óptico. Para isso, em vez de feixes de luz, empregam-se feixes de elétrons para "iluminar" o objeto a ser analisado. As áreas do material que permitem melhor transmissão de elétrons (regiões transparentes aos elétrons) aparecem como áreas claras; as áreas que absorvem ou defletem os elétrons (regiões densas aos elétrons) aparecem como áreas escuras. Os microscópios eletrônicos têm limite de resolução próximo de 2 A° , cerca de 500 000 vezes maior que o do olho humano.

O microscópio óptico (MO)

Os primeiros microscópios de luz ou microscópios ópticos (MO) surgiram no século XVII, principalmente com o holandês Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) e o inglês Robert Hooke (1635-1703). Leeuwenhoek construía microscópios com uma única lente, que chegavam a aumentos de mais de 200 vezes. Esses microscópios com uma lente só são chamados os microscópios simples, e a imagem fornecida não é boa. Hooke construiu seu microscópio com duas lentes: uma delas era a ocular e a outra, a objetiva. Esses microscópios são chamados microscópios

compostos, e a imagem fornecida é melhor que a do microscópio composto.

Coloração

A maioria dos tecidos é incolor, o que torna difícil sua observação ao microscópio óptico. Devido a isso foram introduzidos métodos para a coloração dos tecidos, de modo a tornar seus componentes visíveis e destacados uns dos outros.

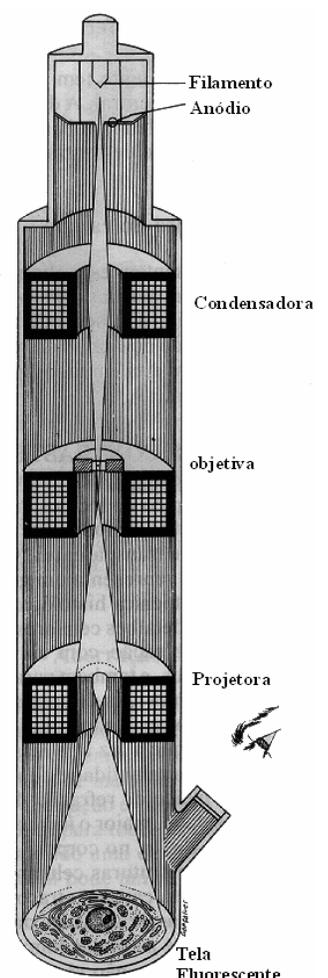
A coloração é feita usando-se geralmente misturas de substâncias químicas denominadas corantes. A maioria dos corantes usados em histologia comportam-se como ácidos ou bases e tendem a formar ligações salinas com radicais ionizáveis presentes nos tecidos. Os componentes dos tecidos que se coram facilmente com corantes básicos são chamados basófilos, sendo chamados de acidófilos os que se ligam a corantes ácidos.

O microscópio eletrônico (ME)

"... No início do século XIX estala definido o limite de resolução do microscópio óptico. Segundo o físico alemão Ernst Abbe (1840-1905), esse limite dependia principalmente do comprimento de onda (λ) da luz com que se observa o objeto. O MO não pode ver pontos do objeto mais próximos do que 0,2 micrometros ($1 \mu\text{m} = 10^{-3} \text{mm}$), ou seja, seu aumento máximo está em torno de mil vezes. (Não muito mais do que Leeuwenhoek conseguia!)

O conhecimento dos fenômenos ondulatórios permite-nos saber que a imagem de um ponto luminoso obtida através de uma lente é formada por um círculo central luminoso cercado de anéis claros, com intensidades decrescentes (difração). Quando buscamos aumentos baixos, não observamos essa figura, mas é ela que determina o limite de aumento para cada cor da luz de iluminação. Quanto maior λ mais crítica é a situação. Dai concluímos que já atingimos o aumento máximo permitido pelo MO, pois as aberrações (distorções) das lentes já foram suficientemente bem corrigidas, mas o nosso olho infelizmente não vê a luz com λ menor que o violeta. É então que entramos com um novo universo que o ME pôde proporcionar.

No início do século XX, o físico francês Louis De Broglie (1892-1987) propôs que partículas quânticas, como o elétron, têm associadas a si ondas cujos



comprimentos variam com o inverso da velocidade. Para elétrons acelerados, por exemplo, por um potencial de 50 quilovolts (um kV = mil volts), λ é aproximadamente dez mil vezes menor do que o da luz verde. Portanto, o efeito da difração para elétrons seria extremamente menor do que para a luz. Esta é a razão teórica da capacidade de aumento do ME.

(...) Na década de 1930, Ernst Ruska (1906-1988), na Alemanha, construiu o que foi considerado como o primeiro ME. Hoje em dia o ME pode chegar a aumentos acima de um milhão de vezes (mil vezes mais que o MO), mas nas primeiras tentativas as imagens eram muito inferiores às do MO, em qualidade e aumento.

O ME consiste basicamente em:

- canhão eletrônico com R fonte de elétrons (fio aquecido), que podem ser acelerados em potenciais em geral de 20 até 100 KV.
- sistema elétrico para suprir as tensões e correntes do aparelho.
- lentes magnéticas, que são bobinas (fios enrolados) para produzir um campo magnético atuante sobre os elétrons, tendo um efeito semelhante ao de uma lente comum para a luz.
- sistema de bombas para produzir alto vácuo (pressão de cerca de 10^{-6} atm) e permitir que os elétrons migrem pelo tubo do aparelho, além de evitar a combustão do filamento pelo oxigênio do ar.
- tela fluorescente para produzir uma imagem final visível, quando atingida pelos elétrons.

O microscópio acima descrito è chamado microscópio eletrônico de transmissão (MET), pois o que se observa é a projeção de uma fatia muito fina do material (como no MO, embora muito mais fina). Mais recentemente, na década de 1960, surgiu o chamado microscópio eletrônico de varredura (MEV), cuja aplicação está na observação da superfície dos materiais. Nesse aparelho, a superfície do material é varrida ponto a ponto por um feixe de elétrons (...)

O preparo de amostras, particularmente as biológicas, é fundamental para obtenção de boas imagens. Para o MET, a amostra deve ser fixada com reagente específico, lavada, desidratada à água é substituída por acetona) e imersa numa **resina epóxi** que endurece após ficar 48 horas numa estufa a 60°C. Aí então ela é cortada em fatias finíssimas (espessura de 0,05 μ m), corada com sais de metais pesados, como urânio e chumbo, e só depois disso observada no MET.

No caso do MEV, como desejamos uma superfície bem preservada e que produza uma boa corrente de elétrons secundários para obtenção de uma boa imagem, o material é fixado como na forma anterior, mas a desidratação é feita por um método (ponto crítico do CO₂ - dióxido de

carbono) que praticamente não deforma o material. Após essa desidratação, a amostra é coberta com fina camada de ouro, por método especial (*sputtering*). Depois disso, ela está pronta para observação no MEV.

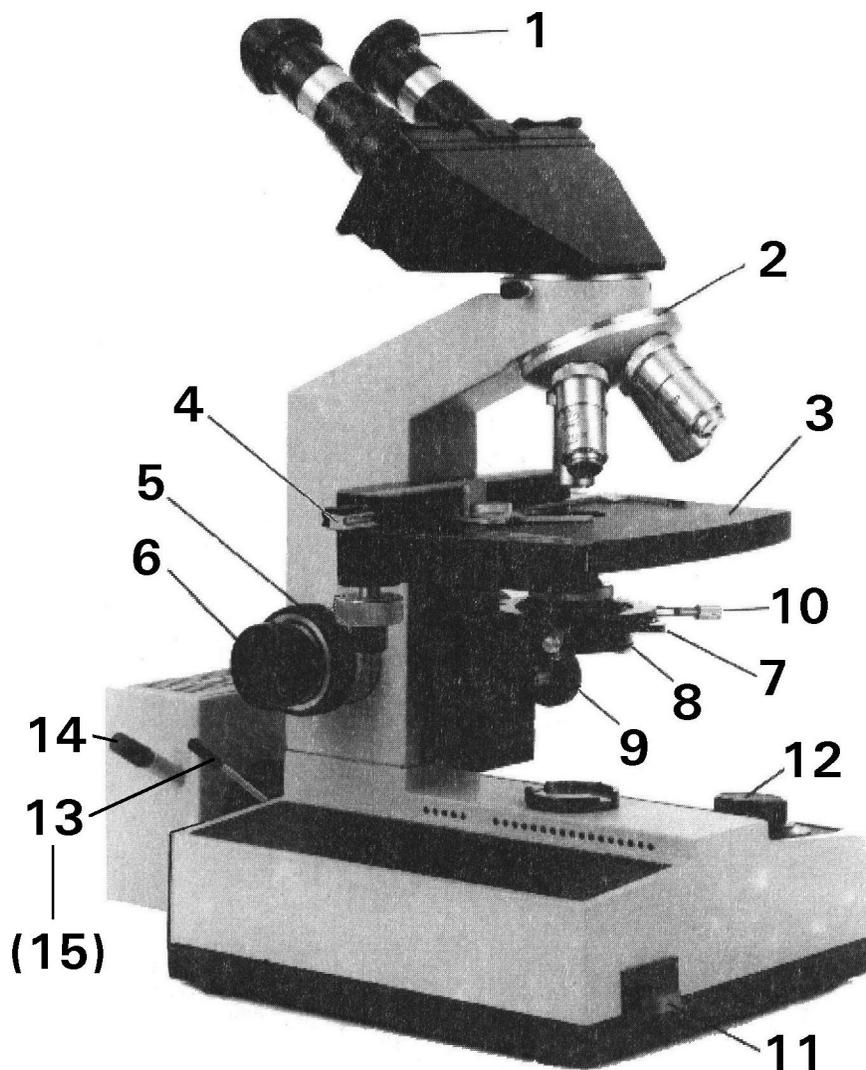
No Brasil temos algumas dezenas de MEs, muitos dedicados à pesquisa biológica. Uma área que tem sido bastante auxiliada pelos MEs é a protozoologia, especialmente no estudo de protozoários patogênicos tanto para os animais quanto para as plantas (...)

A microscopia eletrônica tem se desenvolvido muito nos últimos anos, culminando com a criação do chamado microscópio de tunelamento quântico, cujos autores, Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, do Zurich Research Laboratory (IBM), dividiram com Ruska o Prêmio Nobel de Física de 1986".

MICROSCÓPIO ÓPTICO OU FOTÔNICO

Os microscópios ópticos modernos são descendentes do microscópio composto usado por Robert Hooke. Podem também ser chamados microscópios Fotônicos (do grego photos, luz), pois utilizam luz em seu funcionamento.

Esses aparelhos possuem dois sistemas de lentes de vidro ou cristal (ocular e objetiva) e fornecem ampliações da imagem geralmente entre cem e mil vezes.



1 = ocular

2 = objetivas e revólver

3 = platina

4 = charriot

5 = macrométrico

6 = micrométrico

7 = diafragma no condensador

8 = condensador

9 = botão do condensador

10 = dois parafusos centralizadores do condensador

11 = fonte de luz

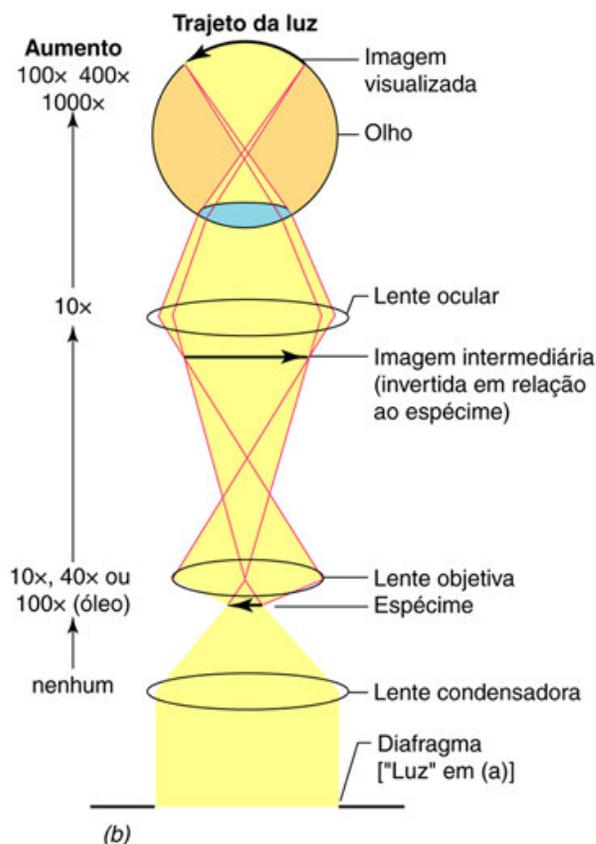
12 = controle de iluminação

13 = diafragma de campo (alavanca no lado esquerdo do microscópio)

14 = dois parafusos de ajuste da lâmpada (esquerdo e direito)

15 = focalizadora da lâmpada (alavanca no lado direito do microscópio - não visível no fotografia)

No microscópio óptico, a luz proveniente do objeto observado atravessa as lentes objetiva e ocular e chega ao olho do observador, onde se forma a imagem ampliada. Se empregarmos, por exemplo, uma lente ocular que amplie dez vezes e uma lente objetiva que amplie cem vezes, o valor final da ampliação será de mil vezes (o aumento da ocular multiplicado pelo aumento da objetiva).



Poder de resolução e limite de resolução

A qualidade de um microscópio não depende apenas da ampliação, mas também do **poder de resolução**, que é a capacidade de distinguir pontos situados muito próximos (adjacentes) no objeto observado. Quanto maior essa capacidade, melhor a definição da imagem.

O **poder de resolução** de um microscópio óptico tem limite. Se dois pontos estiverem a menos de 0,25 micrometro ($1 \mu\text{m} = 1 \times 10^{-6} \text{m}$) um do outro, eles serão vistos como um único ponto. Essa distância é o **limite de resolução**. O **poder de resolução** é função do comprimento de onda de luz visível utilizada (400 a 700 nm) e da abertura numérica (uma medida de capacidade de concentrar luz). O **limite de resolução** é obtido com o menor comprimento de onda da luz visível e com a objetiva de maior abertura numérica.

- Lentes de maior aumento \diamond aberturas numéricas maiores

Quando as objetivas de 100x ou mais (de grande abertura numérica) são utilizadas, aplica-se uma **gota de óleo de imersão** de alta pureza entre a espécime e a objetiva.

Quando o óleo é aplicado, os raios emergentes do espécime são coletados, aumentando assim a quantidade de luz captada pela lente, melhorando a visualização da amostra.

MÉTODOS PARA OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA

- **Preparação de lâminas para microscopia**

Para ser observado ao microscópio óptico é necessário que o material seja translúcido, uma vez que a imagem ampliada forma-se depois de o feixe de luz atravessar o objeto e as lentes.

Após passar por um ou mais processos de preparação, como veremos a seguir, **o material é colocado sobre uma lamina retangular de vidro, que serve de suporte, e recoberto por uma lamínula fina e geralmente quadrada. Esse conjunto é observado ao microscópio.**

- **Esfregação**

No caso de materiais biológicos cujas células são soltas, como o sangue, por exemplo, **pode-se simplesmente colocar sobre a lamina uma gota do material, espalhando-o uniformemente, para que as células distribuam-se em uma fina camada, o que facilita a observação.** Essa técnica é conhecida como esfregação e também pode ser usada para materiais cujas células sejam pouco unidas entre si. Células da parte interna (mucosa) da boca, por exemplo, soltam-se facilmente quando raspadas de leve com um palito, podendo ser espalhada sobre a lamina e observada ao microscópio.

- **Esmagamento**

Alguns **materiais têm células relativamente bem unidas, mas que, por esmagamento, se separam entre a lamina e a lamínula.** Em alguns casos, o material pode ser ligeiramente fervido para que as células se separem, com maior facilidade. **Por exemplo, partes vegetais macias, como pontas de raízes e anteras, podem ser fervidas por alguns minutos em corante e esmagadas entre lamina e lamínula.**

- **Coloração**

Quando se observam ao microscópio preparações de material biológico fresco (vivo), pouco se distingue da estrutura interna das células. As diferentes estruturas celulares apresentam pouco contraste óptico, isto é, têm mais ou menos o mesmo grau de transparência à luz, de modo que a aparência do conteúdo celular é homogênea. Para superar esse problema os citologistas desenvolveram técnicas de coloração, que consiste em mergulhar a célula em uma substância denominada corante, capaz de tingir diferencialmente uma ou mais partes celulares. Há umas poucas substâncias corantes que não matam as células, e por isso são chamadas corantes vitais. Geralmente, porém, os corantes são tóxicos para as células, sendo usados depois que estas foram fixadas.

Há dezenas de tipos de corante, cada um com suas propriedades específicas. A hematoxilina, por exemplo, é um corante azul que apresenta grande afinidade pelo núcleo da célula e pouca afinidade pelo citoplasma. **Em muitos casos, uma mesma preparação pode ser submetida ao tratamento com dois ou mais corantes, o que aumenta a diferenciação entre as estruturas celulares**