
MICROSCOPIA

Prof. Carina Ladeira

Março de 2008

Origem e Evolução do Microscópio

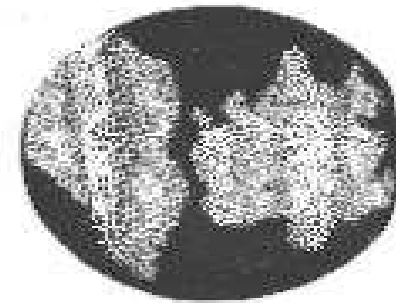
- Galileu descobriu que se dispusesse duas lentes num tubo obteria um aparelho que, olhando de uma das extremidades, permitia a visualização pormenorizada de objectos distantes – o **telescópio**
 - O mesmo aparelho, quando olhado pelo extremo oposto, permitia visualizar objectos pequenos, invisíveis a olho nu – o **microscópio**
 - É neste ponto que se estabelece uma transição do imensamente grande, para o infinitamente pequeno
-

Origem e Evolução do Microscópio

- Paralelamente à Revolução Industrial ocorre a “revolução científica” e começa-se a atribuir um maior valor à experimentação, o que motivou a construção e o aperfeiçoamento de vários instrumentos de laboratório, entre os quais o microscópio
 - O exemplo do microscópio serve também para ilustrar que a investigação científica não é uma actividade neutra, que se desenvolve isoladamente da sociedade, mas antes uma actividade intimamente ligada e influenciada por várias características da sociedade tais como a cultura vigente, a política ou a época em questão
 - **A ciência desenvolve-se em conjunto com a sociedade**
-

Origem e Evolução do Microscópio

- Em 1590, os irmãos holandeses Francis e Zacharias Janssens, construíram o primeiro microscópio óptico composto
- Hooke fabricou um microscópio óptico composto bastante mais aperfeiçoado relativamente ao anterior e examinou um pedaço de cortiça
- Nela observou numerosas cavidades microscópicas, às quais chamou “poros” ou “células” e que lembram a disposição de um favo de mel



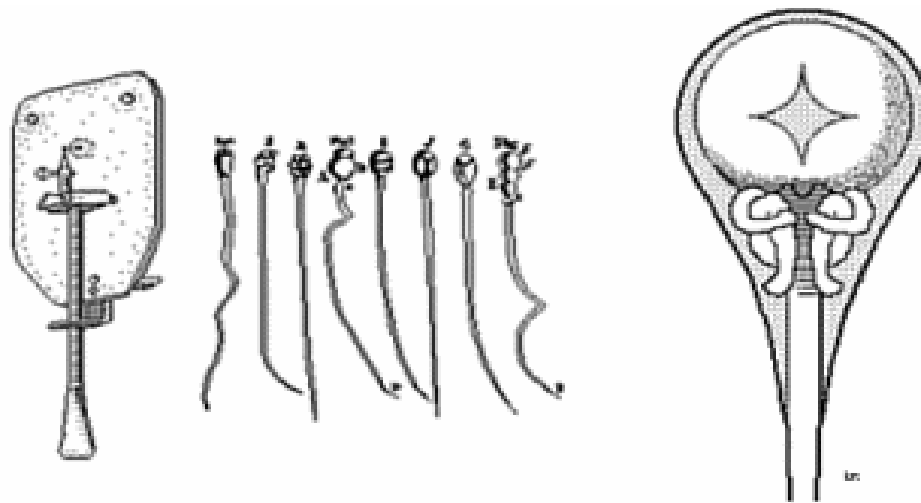
**Microscópio de Hooke
e esquema da secção de
cortiça observada**

Origem e Evolução do Microscópio

- No início do século XVII, os microscópios compostos eram já comuns na Europa
 - No entanto, produziam uma imagem de péssima qualidade devido a aberrações cromáticas produzidas pelas lentes
 - Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) construiu um microscópio óptico simples (apenas com uma lente de boa qualidade) que ampliava mais de 200 vezes
 - Foi assim que se tornou um pioneiro na observação de diferentes espécies microscópicas: protistas, algas e bactérias, as quais desenhou e enviou à *Royal Society* de Londres
-

Origem e Evolução do Microscópio

- Com a ajuda de um microscópio simples, Leeuwenhoek observou e desenhou os “infinitamente pequenos”
- Curiosamente, alguns destes seres microscópicos apresentam grandes homologias com os seres humanos



17.

Origem e Evolução do Microscópio

- Acompanhando o desenvolvimento da mecânica, séc. XVIII, Cuff reúne pela 1ª vez num instrumento a focalização por parafuso, platina para amostras, espelho para luz transmitida e reflectida, que permitem equivalência com a disposição moderna



Origem e Evolução do Microscópio

- Após estas primeiras descobertas, os estudos microscópicos progrediram muito pouco, e nos duzentos anos seguintes, nenhuma descoberta importante foi feita
 - Finalmente, a partir de 1830, começaram a produzir-se lentes acromáticas, que não dão origem a aberrações.
 - Este progresso culminou com a invenção, pelo físico alemão Ernest Abbé, do microscópio acromático com condensador, praticamente idêntico aos utilizados actualmente
-

Origem e Evolução do Microscópio

- Os microscópios também possuem um limite de resolução, que está relacionado com a abertura numérica da lente e com o c.d.o. da radiação que é usada para formar a imagem
 - **Microscópio óptico** – 400-800 nm (luz visível), resolução 0,2 μm (a ampliação total máxima conseguida será de 1000x)
 - **Microscópio electrónico de transmissão** – c.d.o. de um feixe de electrões é de cerca 0,004 nm, resolução limitada a 0,2 nm devido a aberrações do sistema óptico (ampliação máxima conseguida é de 1000000x)
-

Origem e Evolução do Microscópio

- A hipótese de que todos os seres vivos são constituídos por células foi crescendo lenta e gradualmente, à medida que iam sendo aperfeiçoadas as lentes e os microscópios, que permitiram observações mais precisas da estrutura interna dos seres vivos
 - O aparecimento do microscópio permitiu também o nascimento de uma nova ciência: a citologia
 - A citologia é a ciência que estuda a célula que só foi possível conhecer depois do aparecimento do microscópio
-

MICROSCOPIA

- Com a microscopia pretende-se obter imagens ampliadas de objectos/seres vivos muito pequenos, que de outra forma não podiam ser visualizados pelo olho humano
 - Existe um limite para o tamanho dos objectos que podem ser ampliados por um determinado sistema óptico – **resolução do sistema**
 - O limite de resolução do olho humano é cerca de 0,1 a 0,2 mm
-

Constituição do Microscópio

- Um microscópio é constituído fundamentalmente por 3 elementos:
 - **Sistema óptico de ampliação/sistema de lentes**
 - **Fonte de luz/ resolução**
 - **Estágio de visualização/ sistema de ampliação**
 - A complexidade total do sistema é aumentada dramaticamente quando se tenta aumentar a capacidade de ampliação e a qualidade de imagem
-

Sistema de Lentes

- As principais características da ocular são a sua simplicidade de construção, baixo custo e desempenho adequado para muitas aplicações
 - Possui uma cobertura de campo limitada e uma pequena tensão de relaxamento, que é propriedade que a lente possui de evitar o cansaço da visão em observações muito longas
-

Sistema de Lentes – Tipos de Oculares

- **Hi-Point** – oferece a vantagem de tensão de relaxamento maior (isto é bom para quem usa óculos) e possui a desvantagem de uma tensão de ter a cobertura de campo limitada
 - **Widfield** – oferece maior cobertura de campo do que qualquer outra ocular e oferece uma tensão de relaxamento igual à Hi-Point
 - **Hyperplane Compensating** – evita a aberração cromática lateral, isto é, distorções das cores na parte periférica do campo de observação, que é comum nas outras oculares
 - **Ultraplane** – projectada especificamente para aplicações fotográficas
-

Resolução

- A resolução é a mínima distância entre pontos ou partes de um objecto
 - A luz pode ser obtida tanto na forma de ondas como na forma de partículas
-

Sistema de Ampliação

Consiste de um certo n.^o de componentes individuais:

- Lentes objectivas
 - Lentes de campo
 - Lentes oculares
-

Lentes Objectivas

- **Função** – dar uma imagem aumentada da amostra
- São consideradas a parte mais importante do sistema de ampliação

São classificadas como:

- **Acromáticas** – ajustadas a 2 cores, geralmente o vermelho e o verde, ou seja, permite que apenas algumas cores sejam observadas
 - **Apocromáticas** – ajustadas para 3 cores: vermelho, verde e violeta
 - **Não-acromática** – não ajustada para cor alguma; forma halos coloridos ao redor da imagem
-

Lentes objectivas

- Outras propriedades importantes das lentes objectivas são:
 - **Poder de ampliação** (medida de *fineness*): mostra o quanto a imagem fornecida pela lente é ampliada em relação ao tamanho do objecto observado, e é geralmente escrito na lateral da lente
 - **Profundidade Focal**: distância entre a objectiva e a amostra quando a imagem está em foco; se a profundidade focal for muito pequena, a objectiva posiciona-se muito perto da amostra
-

Lentes de Campo

- Instaladas entre a objectiva e a ocular
 - São frequentemente ajustadas com valores típicos na ordem de 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 de ampliação
-

Lentes Oculares

- Podem ser classificadas em 3 categorias: Negativa (Huggenian), Positiva (Ramsden) e Negativa Verdadeira (“Amplifying”)
 - **Objectivo:** ampliar a imagem fornecida pela objectiva e fazer com que ela se forme na retina do olho do observador
 - O valor da sua ampliação é marcado na lateral da ocular
-

Profundidade do Foco

Existem 2 profundidades do foco:

- **Lado da imagem** – comprimento ao longo do eixo óptico para uma posição constante de focalização da objectiva; o nível da imagem é variada sem causar distúrbios na nitidez da imagem no centro do campo
 - **Lado do objecto** – comprimento ao longo do eixo óptico do microscópio para um nível constante da imagem; a posição de focalização da objectiva é variada sem causar distúrbios na nitidez da imagem em um ponto do centro do campo
-

Diâmetro do Campo Ocular

- Para uma melhor observação, o diafragma ocular tem de ter uma abertura grande para o olho observar uma maior área do objecto
 - Geralmente esta área é de 20 mm, no máximo 30 mm
-

Sistema Mecânico

- Um microscópio para ser realmente útil deve ter uma boa estabilidade mecânica
 - Qualquer vibração entre a lâmina e o corpo do microscópio deve ser reduzida ao mínimo absoluto, uma vez que tal vibração pode ser aumentada pelo próprio factor de ampliação do microscópio
 - A base e o braço do microscópio devem fornecer uma rígida estrutura de suporte para a platina e o corpo de forma a resistir às vibrações normais presentes num laboratório
-

Sistema Mecânico

Os principais requisitos do sistema mecânico da platina são:

- Carga e descarga fácil (com o mínimo de manipulação ou dano)
 - Movimentos ortogonais precisos nos eixos x e y
 - Folga mínima nas engrenagens
 - Necessidade de acoplamento entre os movimentos nas direcções x e y

 - Além da estabilidade mecânica, o microscópio deve ter em conta os padrões de ergonomia estabelecidos para que o usuário desse equipamento se sinta confortável ao fazer as suas observações, principalmente aquelas que exigem um tempo maior
-

Sistema de Focalização

Existem 2 tipos:

- **Focalização comum** – mecanismo de direcção que move o braço ou o plano da amostra; na maioria dos modelos modernos o movimento é feito no plano da amostra
 - **Focalização Fina** – os movimentos são precisamente controlados para se obter uma profundidade de foco maior se utilizar objectivas de alta potência
-

Sistema de Iluminação

- O sistema completo consiste em: fonte de luz, condensador de iluminação, diafragma de campo, um espelho ajustável, um condensador de foco e um diafragma de abertura
 - O diafragma que equipa o condensador é responsável pelo controle da abertura angular do cone de luz para a iluminação da amostra
 - Num microscópio o sistema de iluminação pode estar situado abaixo ou acima do plano de amostra
-

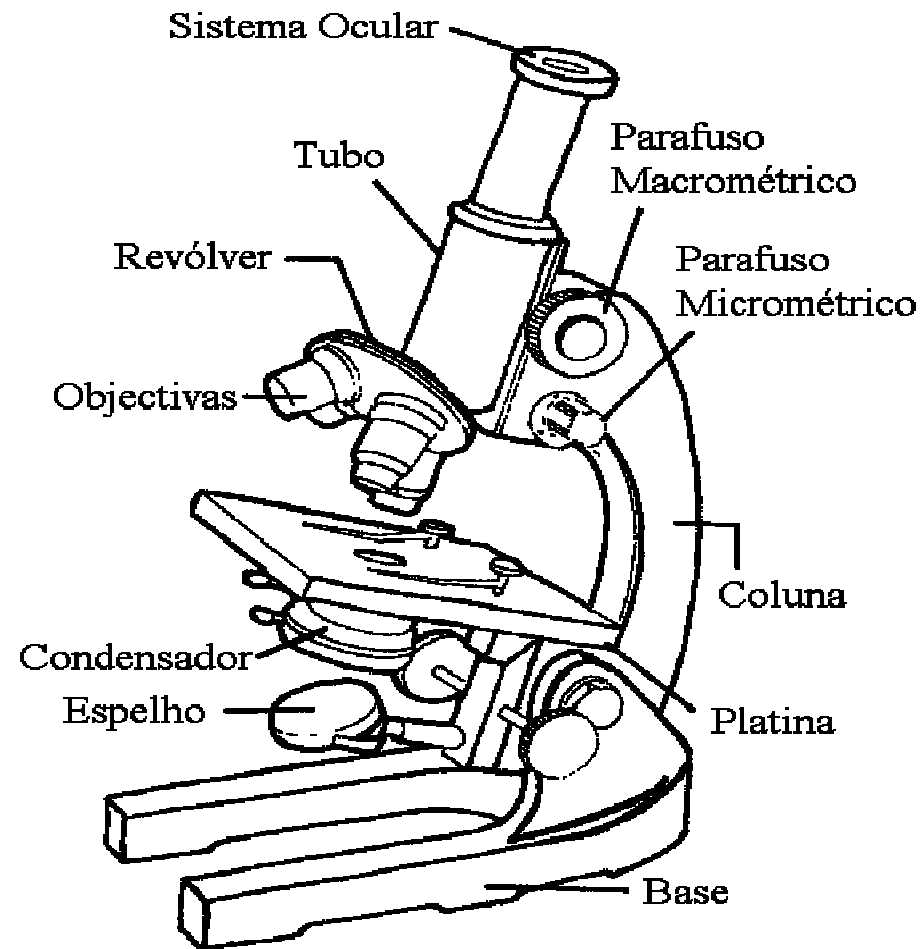
Sistema de Iluminação

- A maioria dos microscópios disponíveis utilizam os sistemas de iluminação de campo claro (*brightfield*), campo escuro (*darkfield*) e de interferência diferencial
 - Alguns microscópios possuem sistemas de iluminação de fluorescência
 - No modo de iluminação de campo claro a luz viaja ao longo do eixo óptico, através da objectiva em direcção à mostra que esta a ser observada
 - A amostra é vista pela luz que ela reflecte
 - Filtros especiais são utilizados para abrandar a luz e aumentar o contraste
-

Tipos de Microscópios

- Microscópio Óptico
 - Microscópio Eletrónico
 - Microscópio de Fluorescência
 - Microscópio de Contraste de Fase
 - Microscópio Óptico de Fundo Escuro
 - Microscópio Confocal
 - Microscópio Eletrónico de Varrimento
-

Microscópio Óptico



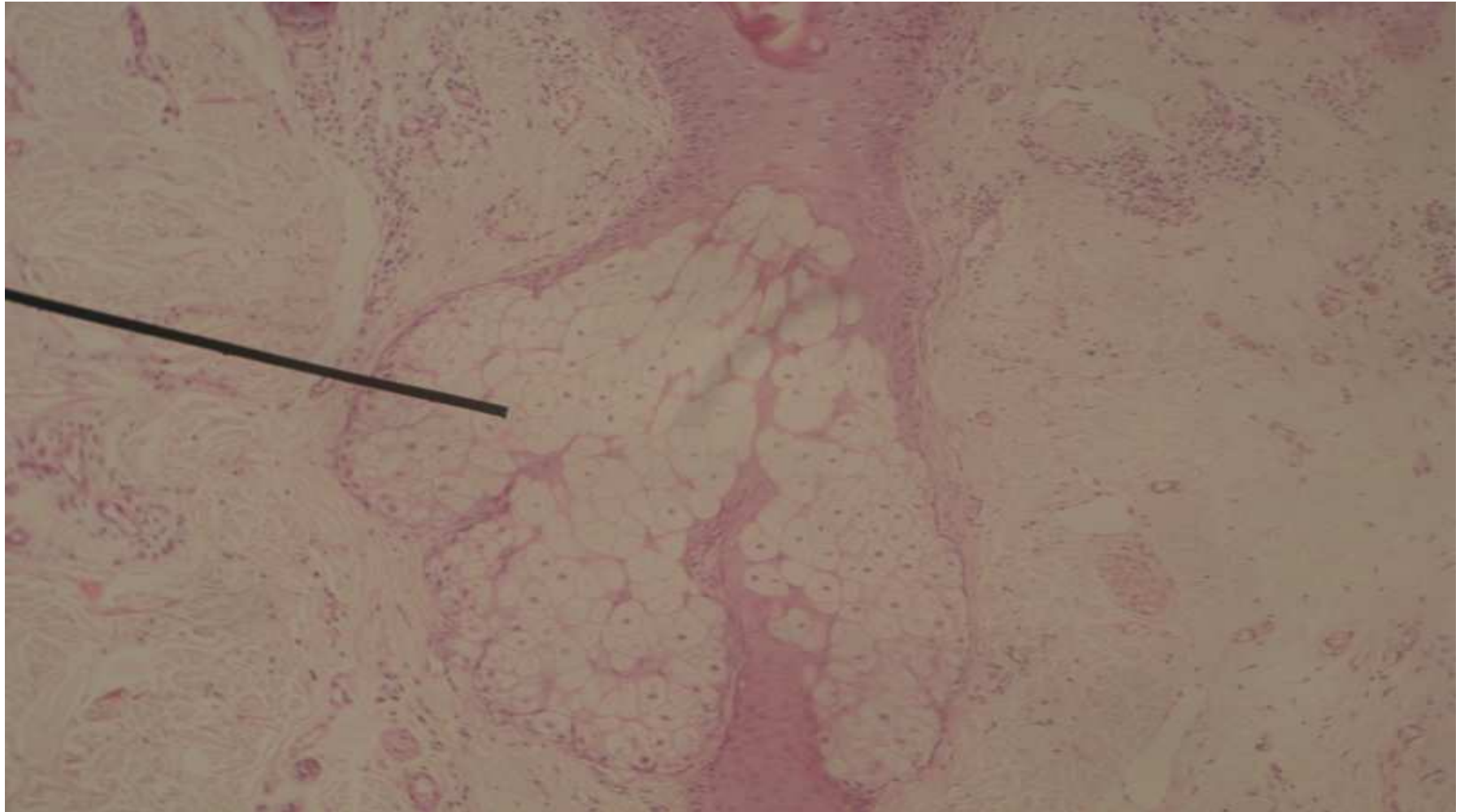
Microscópio Óptico

- O microscópio apresenta 2 sistemas de lentes convergentes: a **objectiva e a ocular**
 - A **objectiva** é um conjunto de lentes que apresenta pequena distância focal e que fornece uma imagem real e aumentada do objecto que é observado
 - A **ocular**, também formada por lentes convergentes, funciona como uma lupa, que nos dá uma imagem virtual e aumentada da imagem real que se formou pela objectiva
-

Microscópio Óptico

- A objectiva e a ocular são dispostas nas extremidades de um cilindro oco, a coluna do microscópio, e possui a capacidade de se aproximar ou afastar da amostra para que se tenha a imagem perfeita
 - A potência do microscópio é resultado do produto da ampliação linear da objectiva pela potência da ocular
-

Imagem de Microscopia Óptica



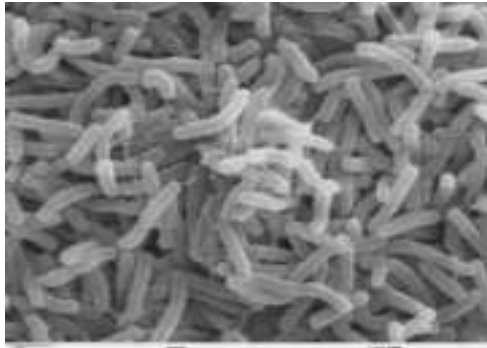
Microscópio Electrónico

- Em 1930, Zworkin inventa o microscópio electrónico
 - O seu uso veio a revelar a ultra-estrutura celular, permitindo aumentar ainda mais o objecto da biologia
 - No microscópio electrónico a luz é substituída por um feixe de electrões que se propaga no vácuo
 - Este microscópio não utiliza elementos ópticos, mas lentes electrostáticas ou magnéticas, do que resulta uma ampliação e um poder de resolução muito maior
-

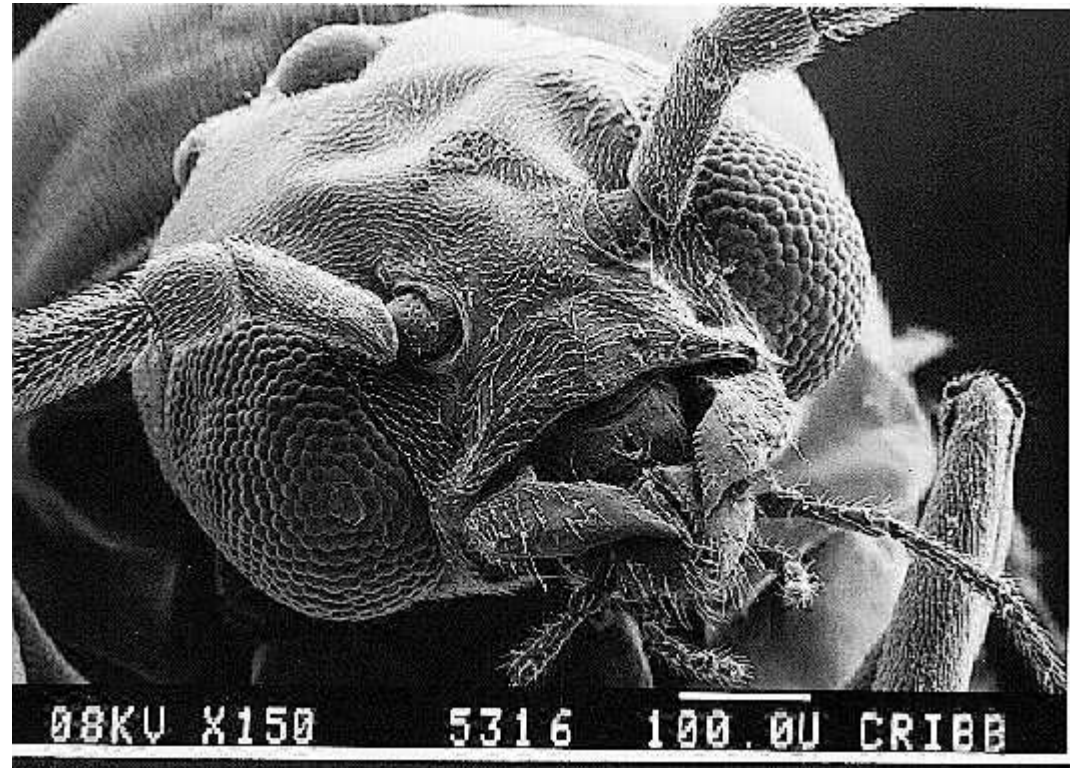
Microscópio Eletrônico



Imagens em ME



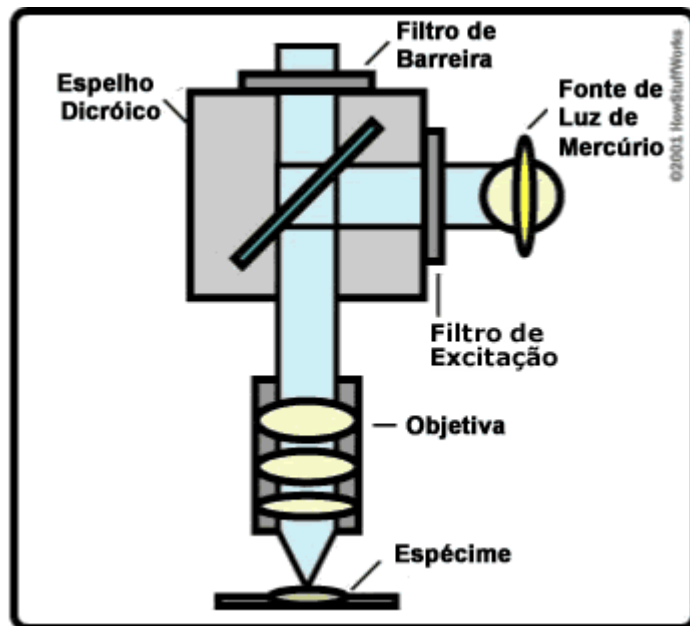
Vibrio cholerae ao ME



Microscópio de Fluorescência

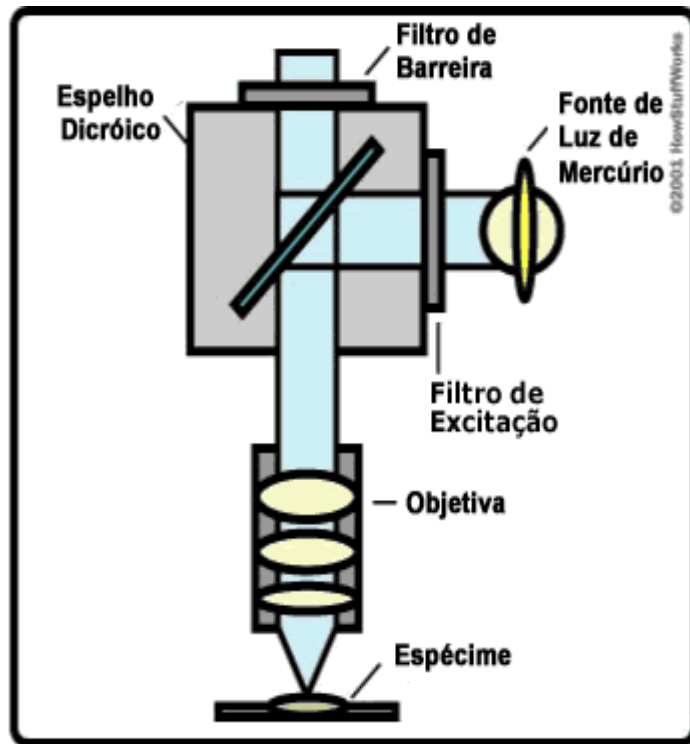
- O **microscópio de fluorescência** baseia-se na propriedade de certas substâncias que absorvem luz de determinado comprimento de onda e emitem luz de um c. d. o. superior
 - A clorofila é uma substância fluorescente quando iluminada com luz U.V.
-

Microscópio de Fluorescência



- A microscopia de fluorescência usa uma lâmpada de mercúrio ou outra para produzir luz ultravioleta
- A luz vem do microscópio e incide sobre um **espelho dicroico** - espelho que reflecte c.d.o. de um determinado intervalo e permite que c.d.o. de outro intervalo passem através dele
- O espelho dicroico reflecte a luz ultravioleta até o espécime

Microscópio de Fluorescência



- A luz UV excita a fluorescência dentro das moléculas da amostra
- A objectiva colecta a luz de c.d.o. fluorescente que foi produzida
- Esta luz fluorescente passa através do espelho dicroico e de um filtro de barreira (capaz de eliminar outros c.d.o. além do fluorescente), levando-a para formar a imagem na ocular

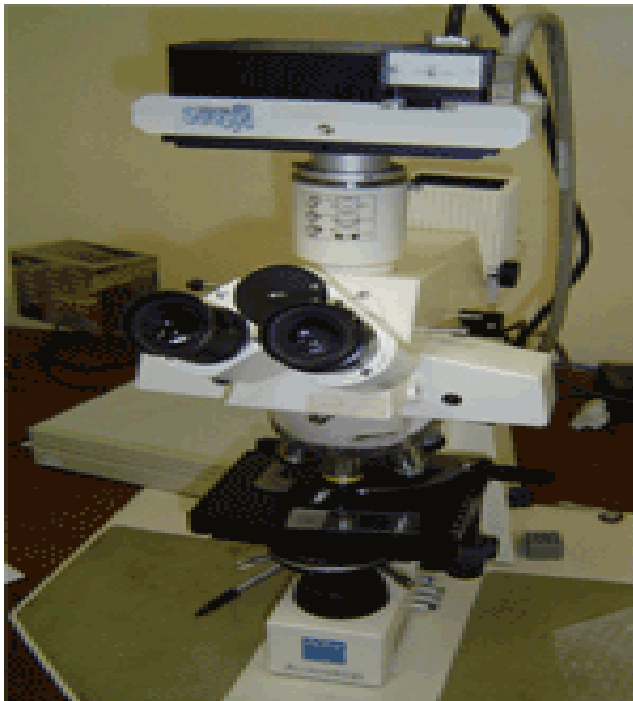
Microscópio de Fluorescência

- As moléculas fluorescentes dentro da amostra podem ocorrer naturalmente ou ser introduzidas
 - Ex.: é possível corar células com um corante chamado **calceína-AM**
 - Este corante, por si só, não é fluorescente
 - A porção AM (acetoximetil) da molécula oculta uma porção da molécula de calceína que liga o cálcio, este sim, fluorescente
 - A calceína/AM hibridiza na célula
-

Microscópio de Fluorescência

- Através de uma enzima celular é removida a porção AM que prende a calceína dentro da célula fazendo com que ela ligue o cálcio tornando-o verde fluorescente sob a luz ultravioleta (células mortas deixam de ter essa enzima)
 - As células mortas podem ser visualizadas através do Iodeto de propídio
 - O Iodeto de propídio liga-se ao DNA no núcleo e fica com a cor fluorescente vermelha sob a luz ultravioleta
 - Essa técnica de duplo corante é usada em estudos toxicológicos para determinar a percentagem da população de células que perece quando tratada por um produto químico de protecção ambiental
-

Microscópio de Fluorescência



Imagens de Microscopia de Fluorescência

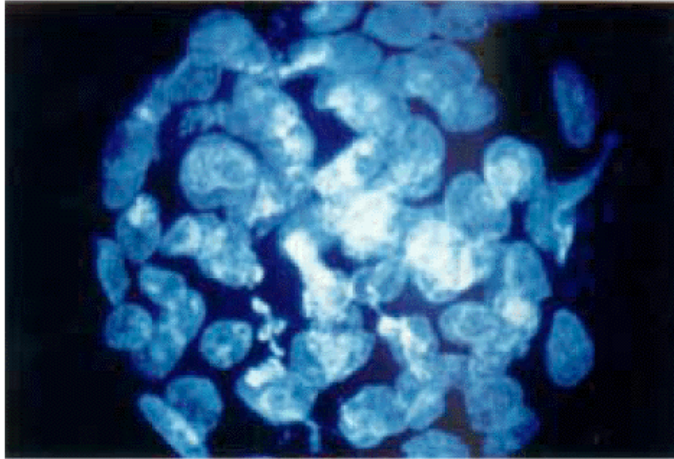
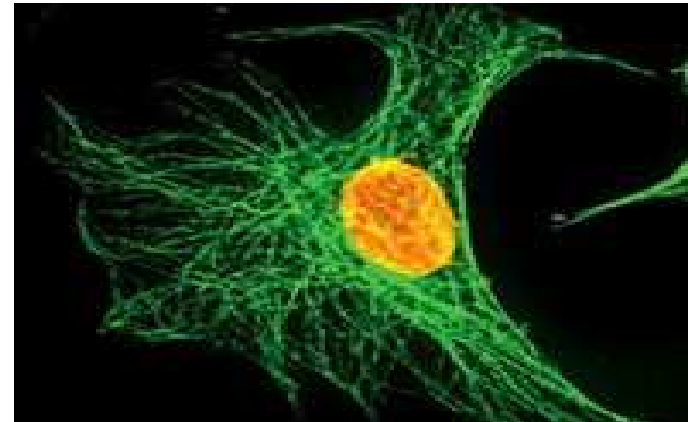
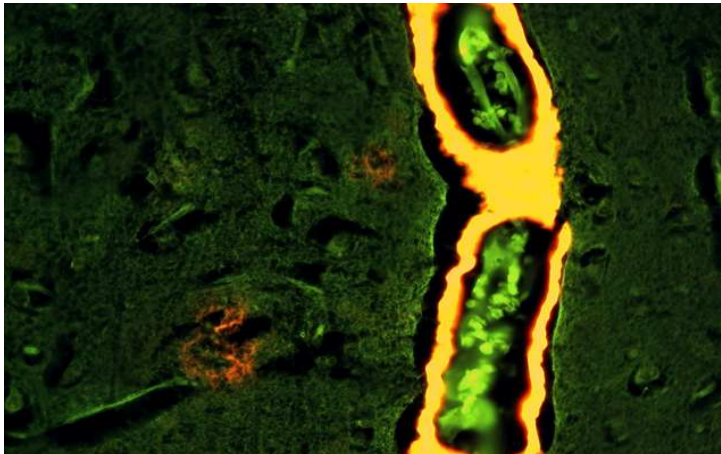
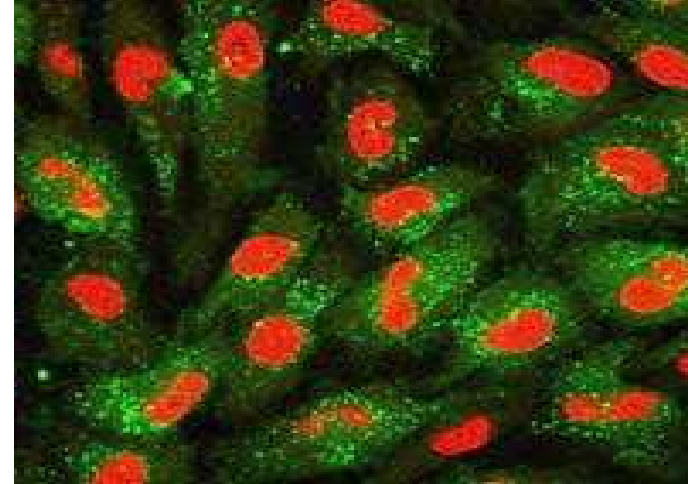


Figura 3 - Blastocisto corado pela técnica de coloração de Hoescht, no dia 8 pós-fertilização *in vitro* (400 X).



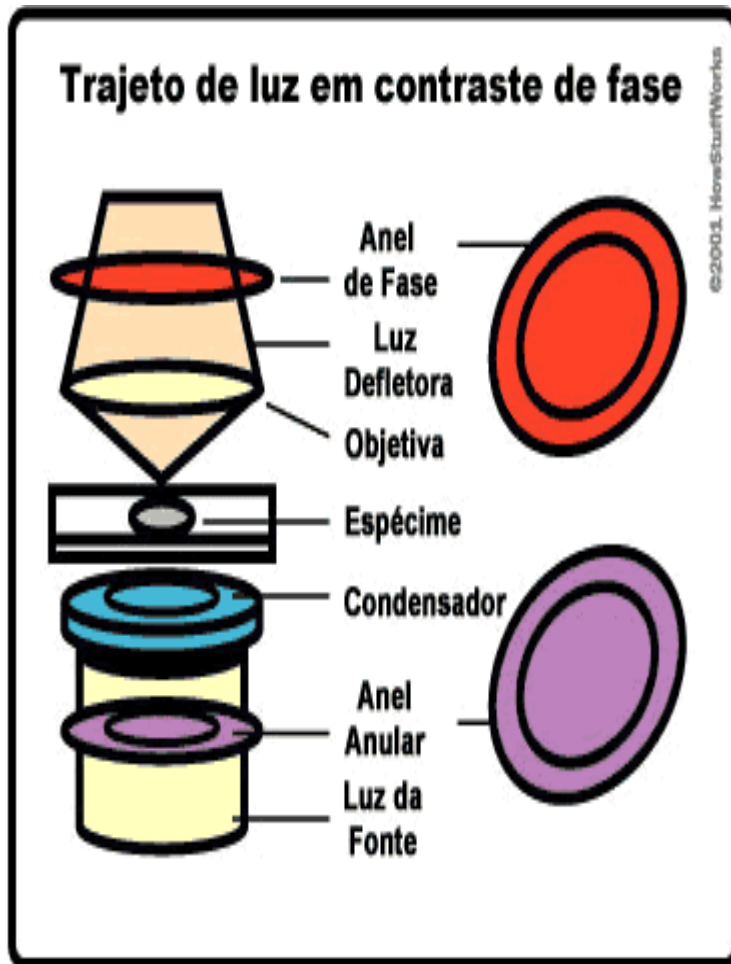
Microscópio de Contraste de Fase

- O **microscópio de contraste de fase** tem, associado ao condensador, um diafragma especial que faz com que a luz passe apenas por certas zonas
 - Deste modo, mesmo que o material biológico seja muito fino é possível observar a imagem pretendida, pois o contraste é muito superior
 - É a melhor técnica para examinar espécimes vivos (como células cultivadas, por exemplo)
-

Microscópio de Contraste de Fase

- A microscopia de contraste de fase é especialmente útil no exame da estrutura e de movimento de organitos maiores como o núcleo e mitocôndrias de tecidos vivos, transparentes e não-corados
 - Gera uma imagem com diferentes graus de obscuridade ou luminosidade
-

Microscópio de Contraste de Fase



■ A luz é separada pelos anéis anulares na objectiva e pelo condensador

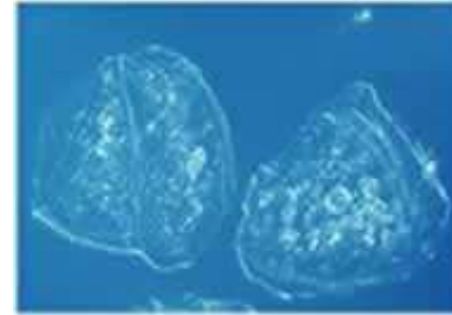
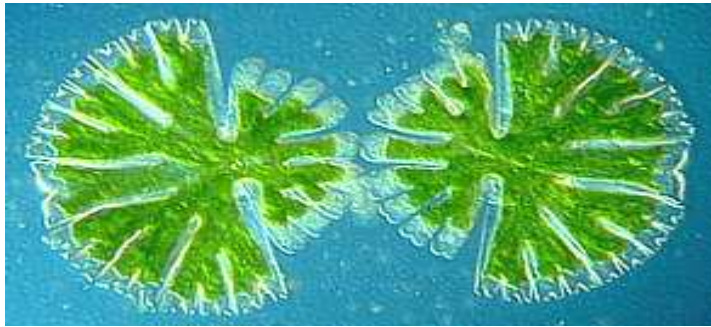
■ A luz que passa através da parte central do trajecto de luz é recombinaada com a luz que se propaga em torno da periferia da amostra

■ A interferência produzida por esses dois trajectos produz imagens nas quais as estruturas densas aparecem mais escuras do que o fundo

Microscópio de Contraste de Fase

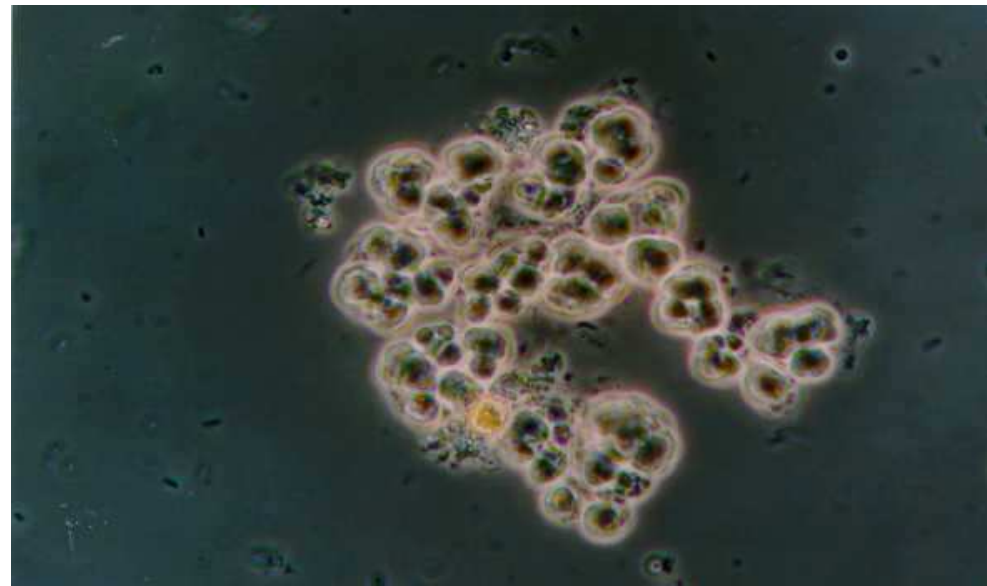
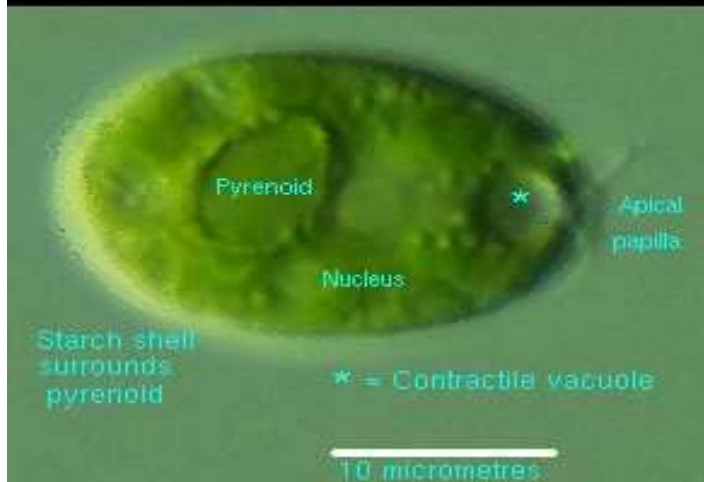


Imagens de Microscopia de Contraste de Fase



Chlamydomonas moewusii

Gerloff



Microscópio Óptico de Fundo Escuro

- O **microscópio óptico de fundo escuro** tem associado um diafragma opaco na zona central
 - A luz passa por aberturas laterais que formam uma coroa circular
 - O objecto aparece brilhante num fundo escuro
 - Promove um elevado contraste entre o objecto e o fundo
-

Microscópio óptico de Fundo Escuro



Imagem de Microscopia óptica de Fundo Escuro



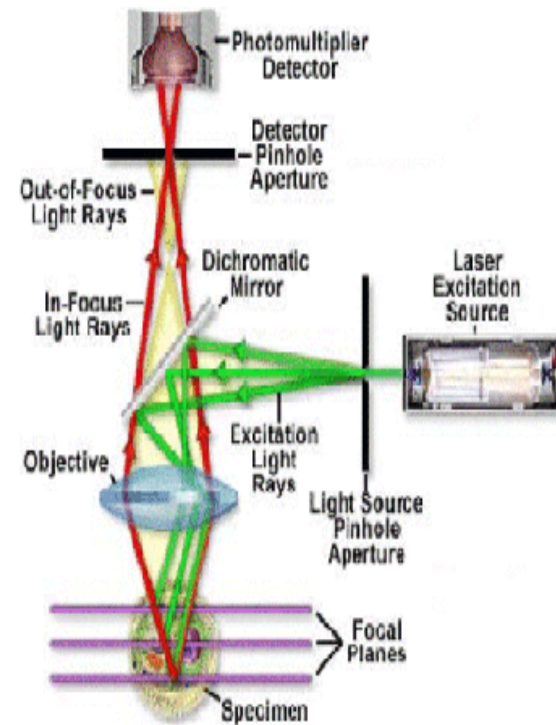
Microscópio Confocal

- O **microscópio confocal** permite visualizar imagens de diferentes planos do objecto a faz a sua sobreposição
 - Possibilita a criação de imagens tridimensionais
 - Funciona com raios laser que visualizam um único plano de cada vez, de modo a não haver sobreposição de imagens
-

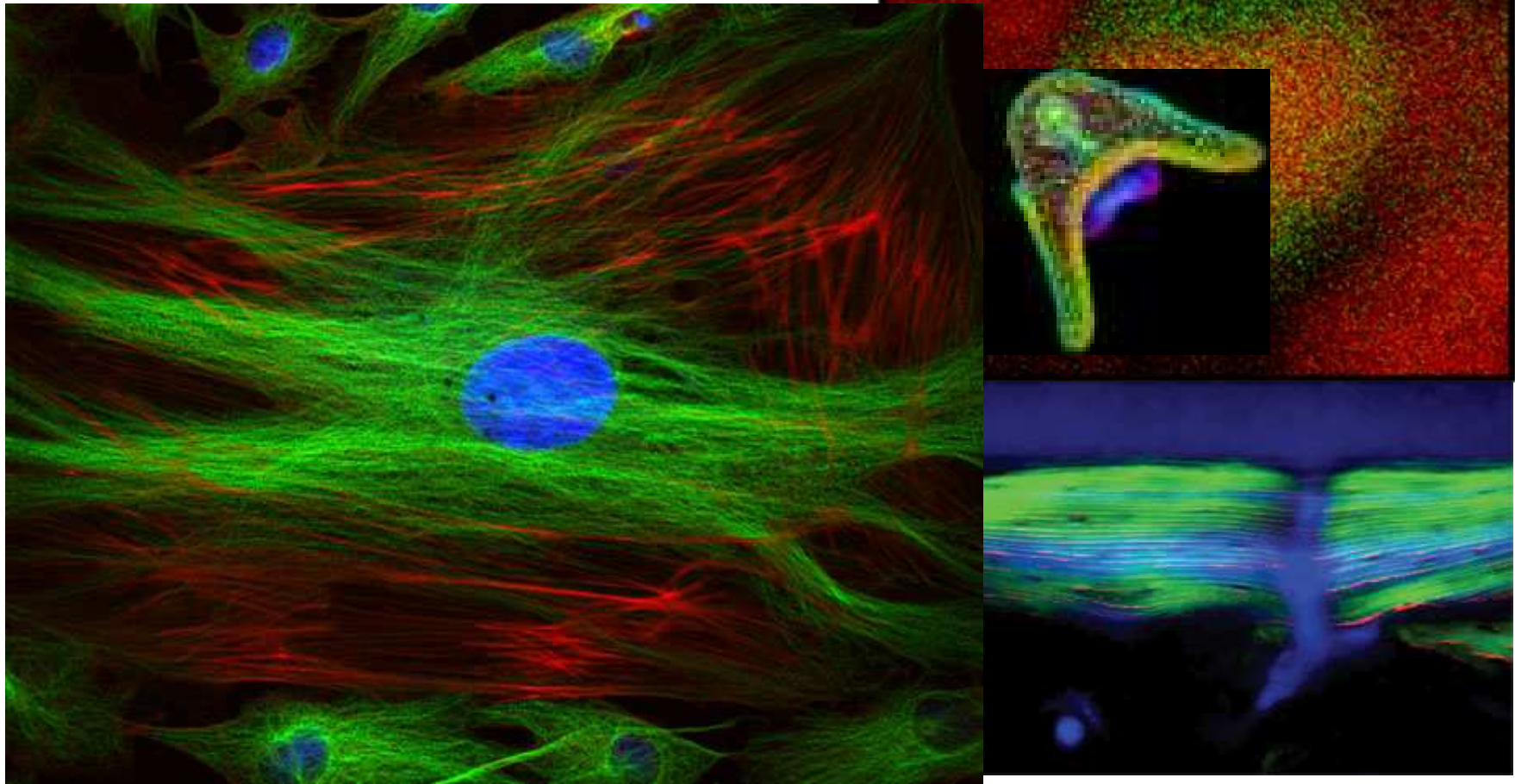
Microscópio Confocal

- O Microscópio confocal consiste um microscópio óptico que incorpora 2 diafragmas:
 - Um **diafragma de iluminação**, geralmente de tamanho invariável e localizado atrás da fonte luminosa
 - Um **diafragma de detecção**, de tamanho variável situado à frente do fotodetector
 - A utilidade deste diafragma de detecção é eliminar a luz proveniente de planos superiores e inferiores do plano focal, aumentando a claridade e a resolução da imagem
 - Esta capacidade de obter secções ópticas, é a característica principal e exclusiva do microscópio confocal
-

Microscópio Confocal



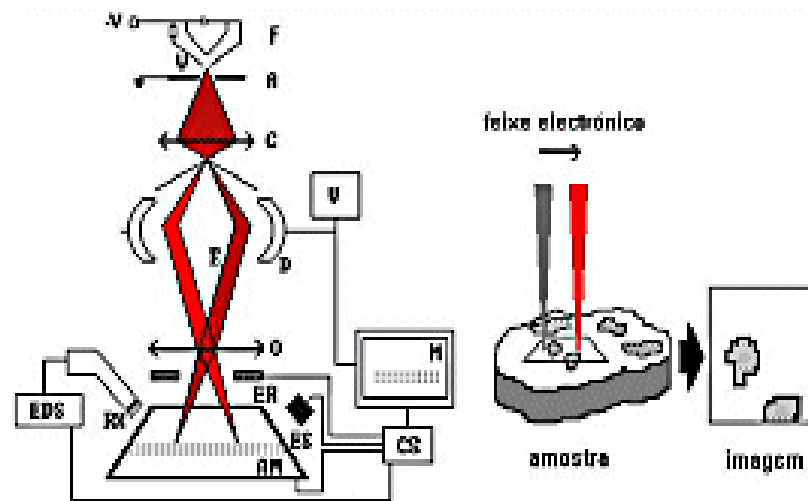
Imagens em Microscópio Confocal



Microscópio Electrónico de Varrimento

- O **microscópio electrónico de varrimento** permite obter imagens a 3 dimensões. Outro nome é microscópio de *scanning*
 - O material é recoberto de ouro ou paládio
 - Um feixe de electrões é emitido e vai embater com o material que está revestido
 - Em vez de os electrões penetrarem no material, são reflectidos
 - O microscópio tem um detector que recebe os electrões e cria a imagem
-

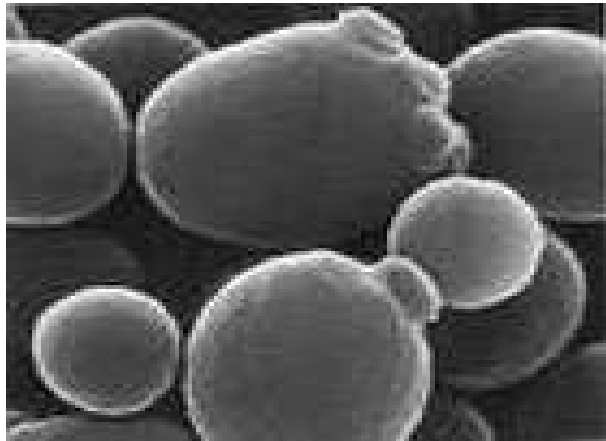
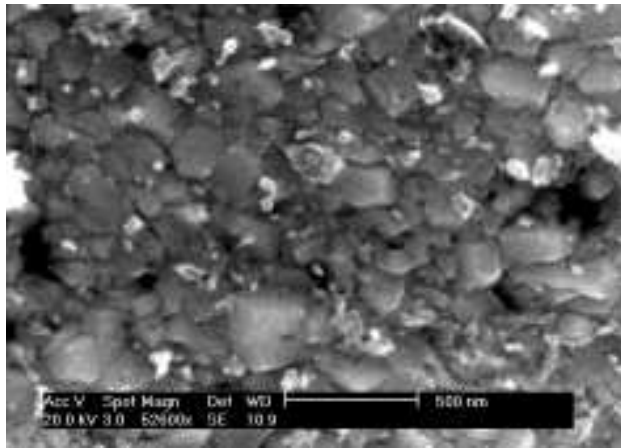
Microscópio Electrónico de Varrimento



**Microscopia Electrónica de Varrimento
SEM**



Imagens de Microscópio Electrónico de Varrimento



RESUMO

- Origem e evolução do microscópio
 - Constituição do microscópio
 - Tipos de microscópio:
 - Óptico
 - Electrónico
 - Fluorescência
 - Contraste de fase
 - Óptico de Fundo Escuro
 - Confocal
 - Electrónico de varrimento
-