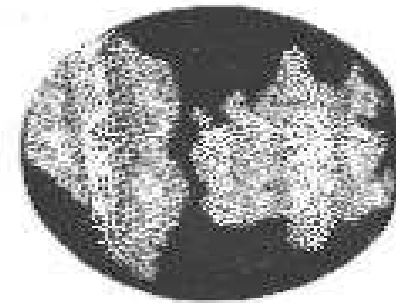

MICROSCOPIA

Prof. Carina Ladeira

Março de 2009

Origem e Evolução do Microscópio

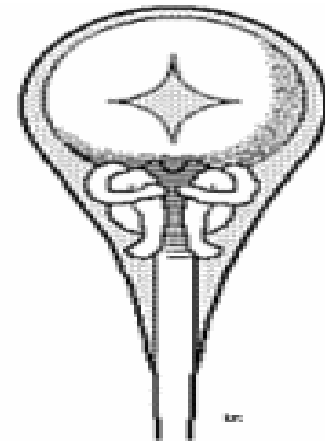
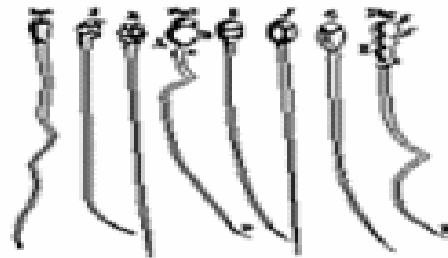
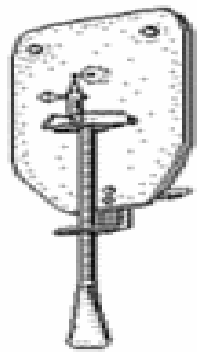
- Em 1590, os irmãos holandeses Francis e Zacharias Janssens, construíram o 1º microscópio óptico composto
- Hooke fabricou um microscópio óptico composto bastante mais aperfeiçoado relativamente ao anterior e examinou um pedaço de cortiça
- Nela observou numerosas cavidades microscópicas, às quais chamou “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

- Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) construiu um microscópio óptico simples (apenas com uma lente de boa qualidade) que ampliava mais de 200X
- 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



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



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 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 distância mínima 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-acromáticas** – 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 e Oculares

Lentes de Campo

- Instaladas entre a objectiva e a ocular

Lentes Oculares

- Podem ser classificadas em 3 categorias: Negativa, Positiva e Negativa Verdadeira
 - Objectivo: ampliar a imagem fornecida pela objectiva e fazer com que ela se forme na retina do olho do observador
-

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 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 amostra que está 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 Óptico

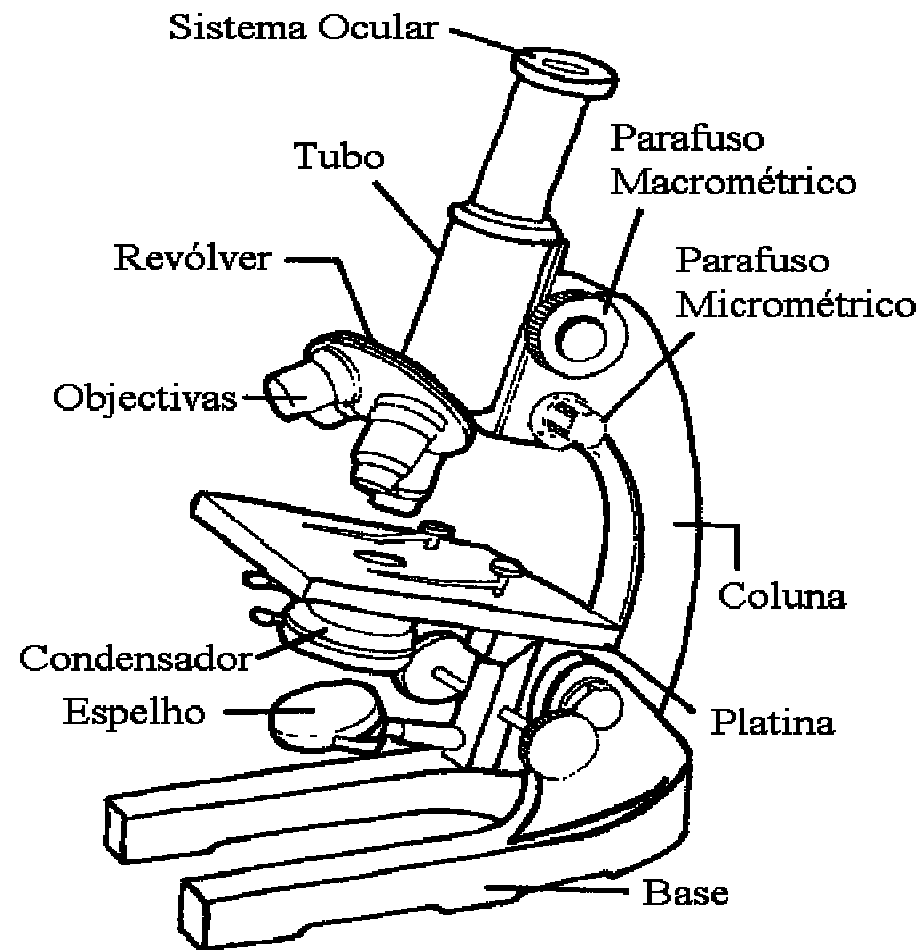
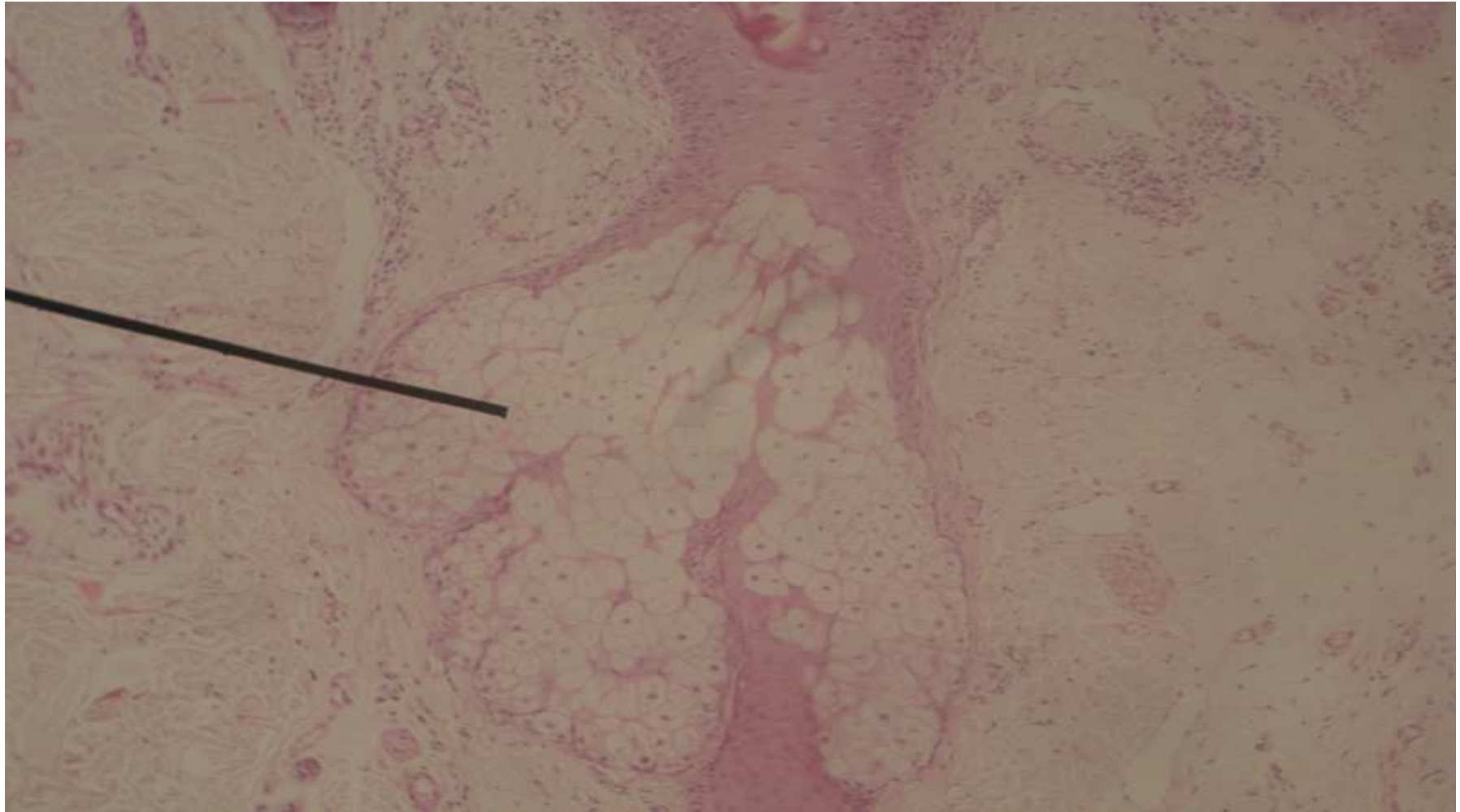


Imagem de Microscopia Óptica



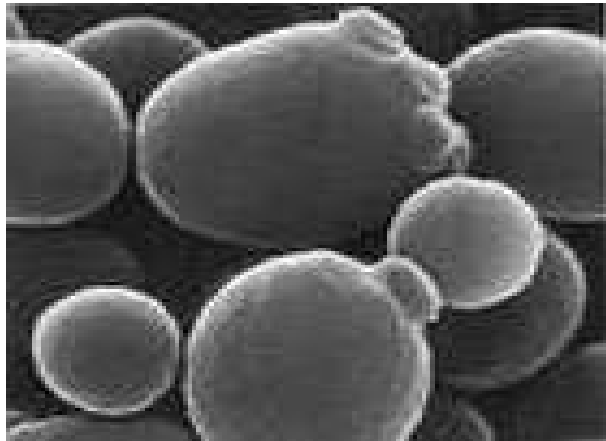
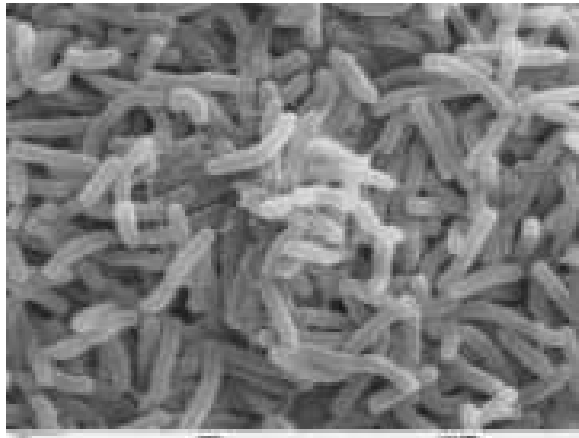
Microscópio Electrónico

- 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



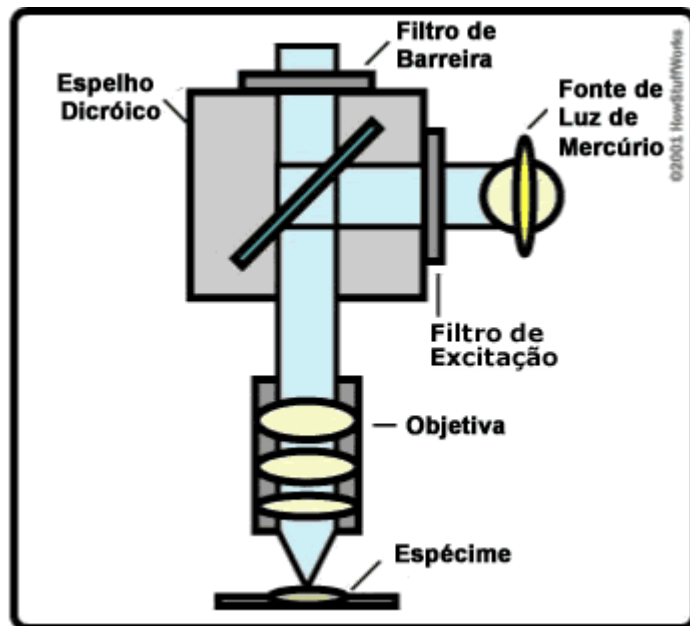
Imagens de Microscópio Electrónico



Microscópio de Fluorescência

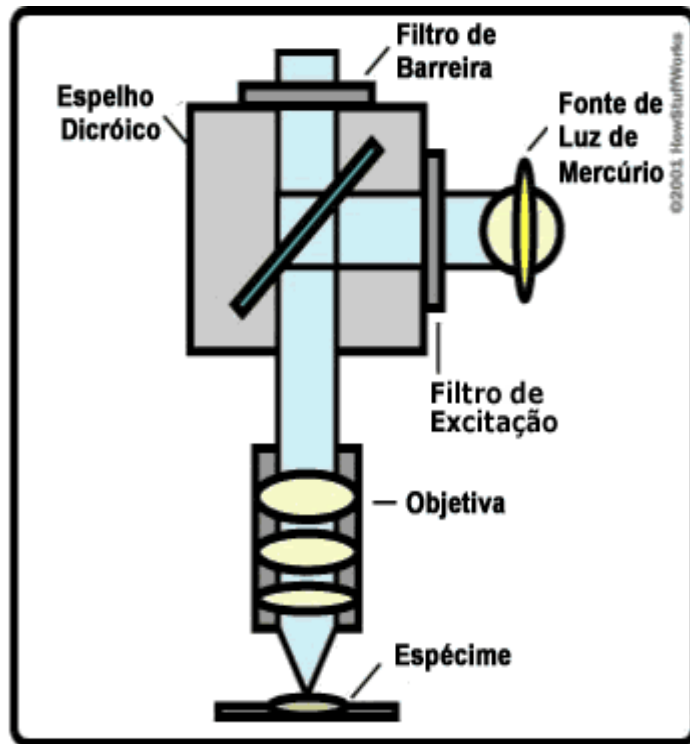
- O **microscópio de fluorescência** baseia-se na propriedade de certas substâncias que absorvem luz de determinado comprimento de onda e emitam luz de um c. d. o. superior
 - A clorofila é uma substância fluorescente quando iluminada com luz U.V.
-

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 passe 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



Imagens de Microscopia de Fluorescência

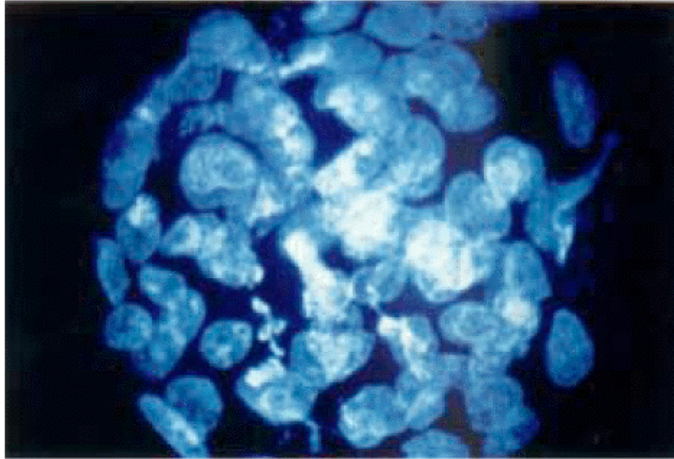
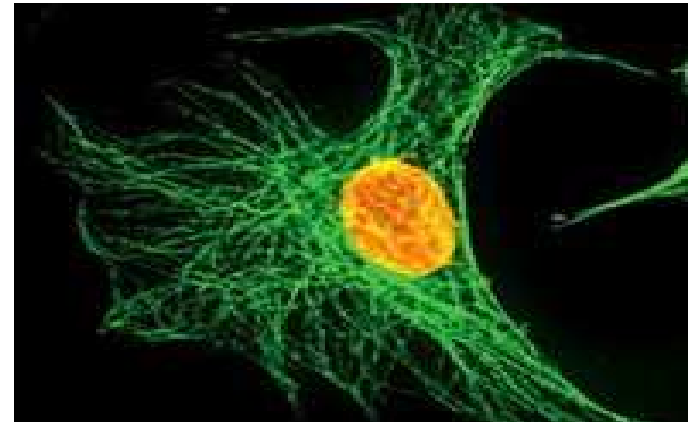
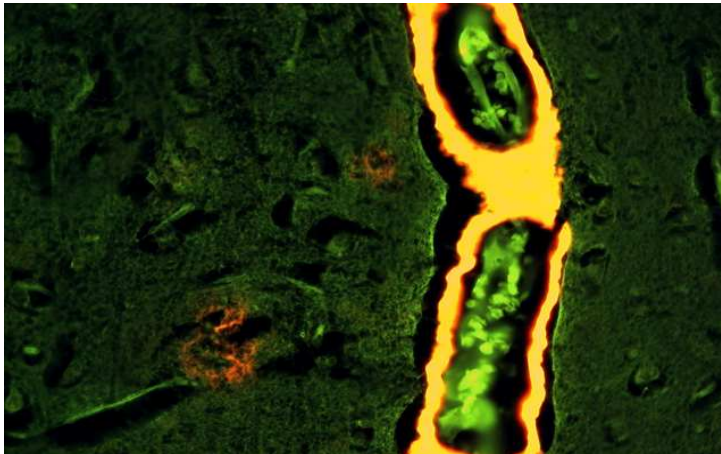
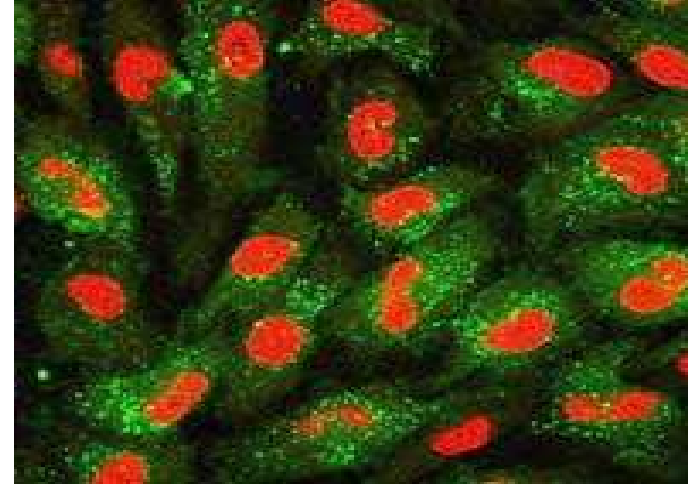


Figura 3 - Blastocisto corado pela técnica de coloração de Hoescht, no dia 8 pós-fertilização *in vitro* (400 X).



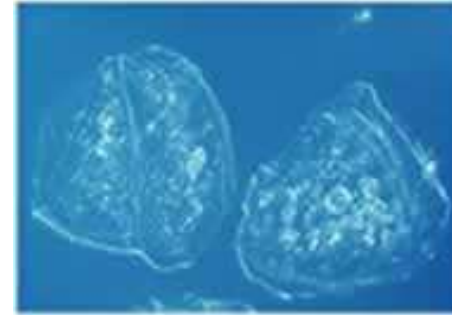
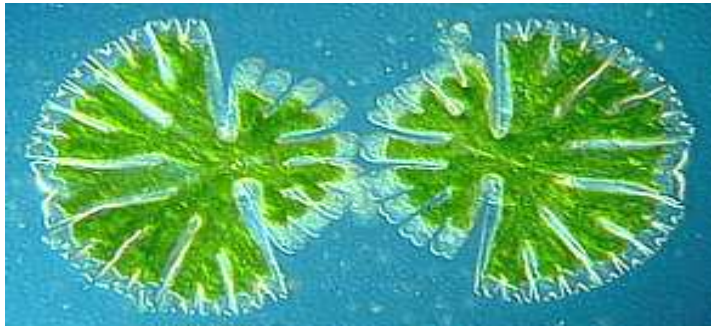
Microscópio de Contraste de Fase

- 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 (ex. células em cultura)
 - Produção imagens nas quais as estruturas densas aparecem mais escuras do que o fundo
-

Microscópio de Contraste de Fase

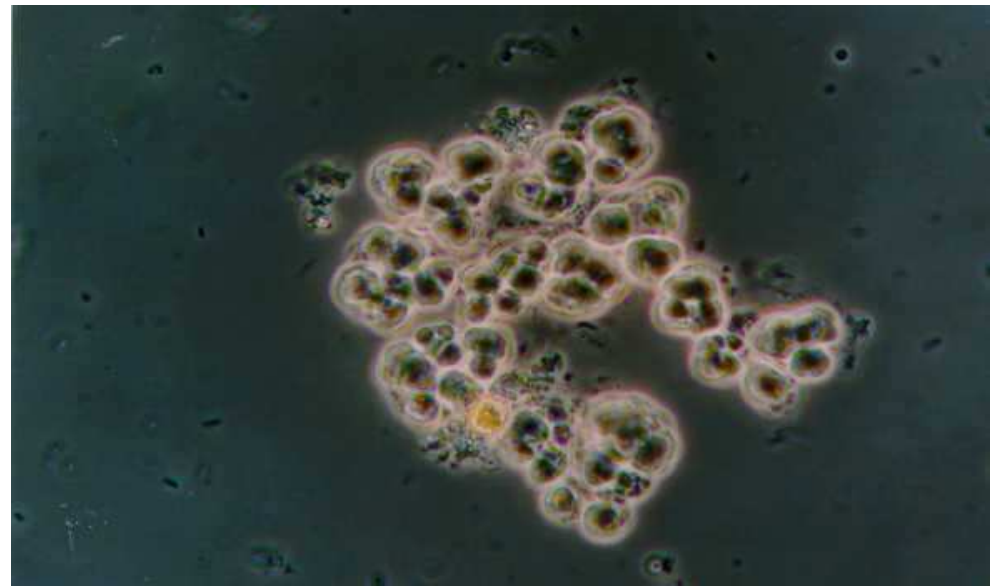
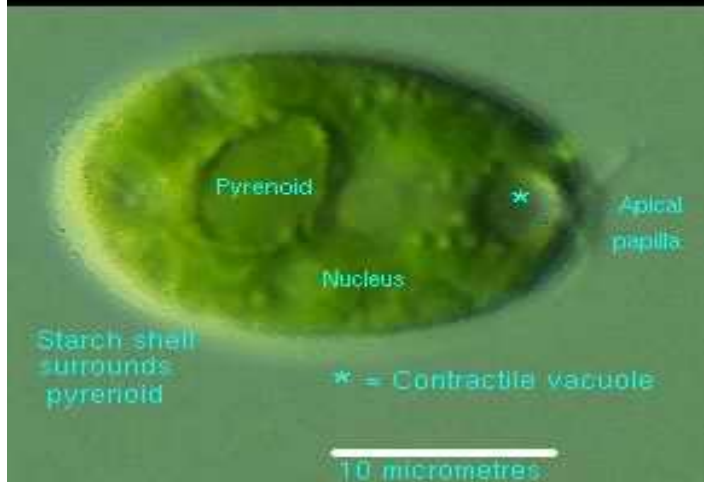


Imagens de Microscopia de Contraste de Fase



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
-

Imagem de Microscópio óptico de Fundo Escuro



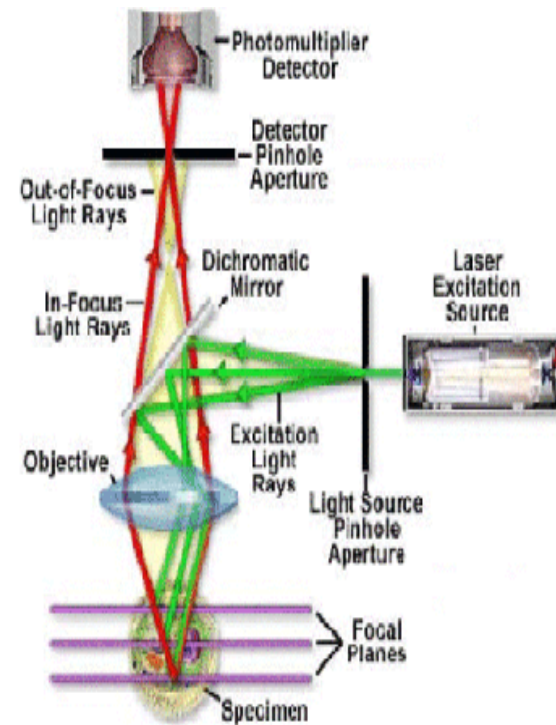
Microscópio óptico de Fundo Escuro



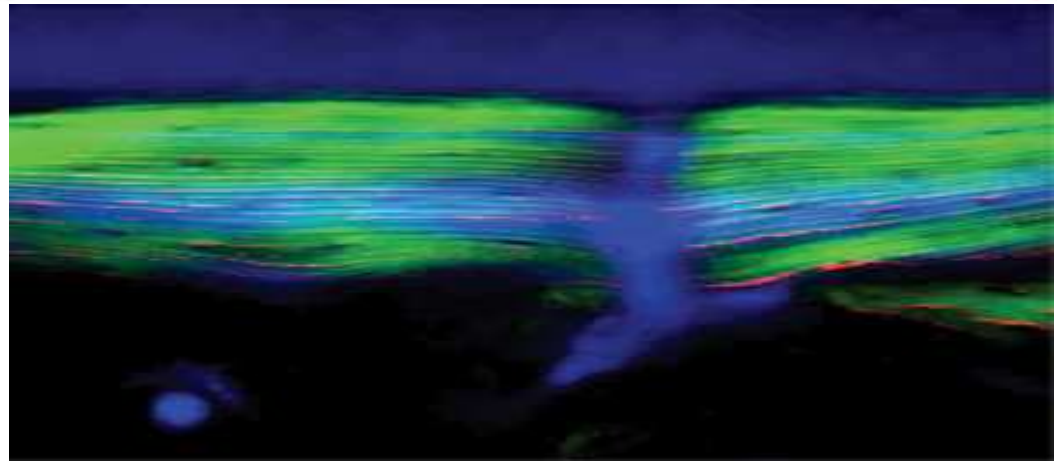
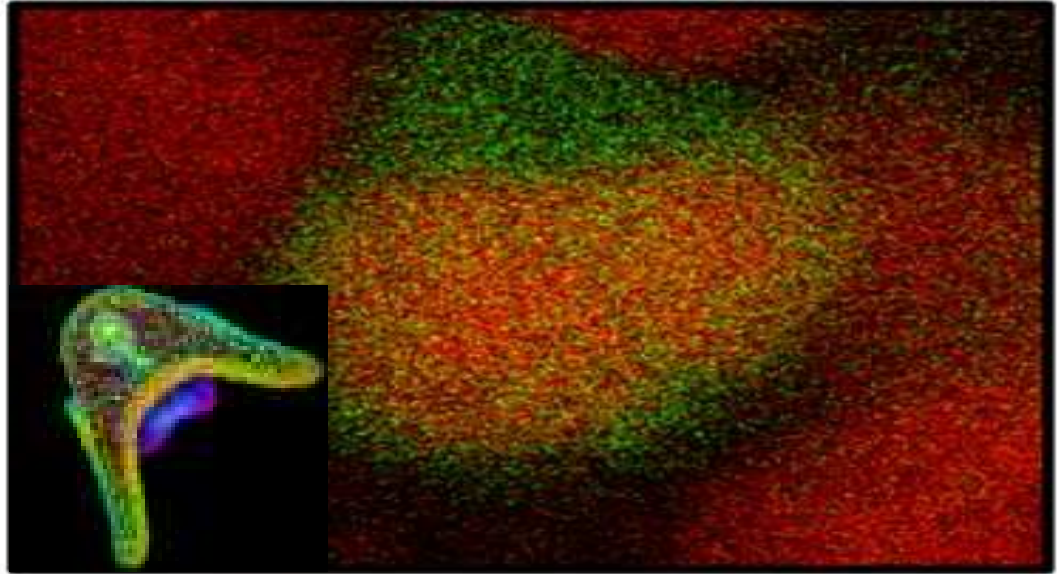
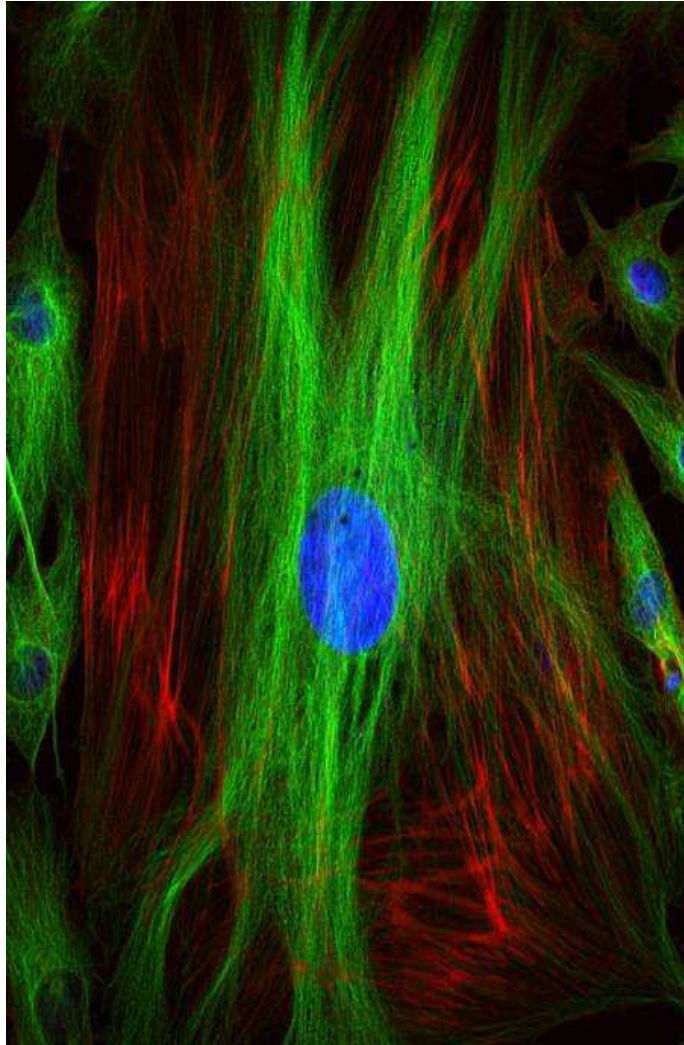
Microscópio Confocal

- 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
 - Esta capacidade de obter secções ópticas, é a característica principal e exclusiva do microscópio confocal
-

Microscópio Confocal



Imagens em Microscópio Confocal



RESUMO

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