

---

# MICROSCOPIA

---

Prof. Carina Ladeira

Abril de 2010

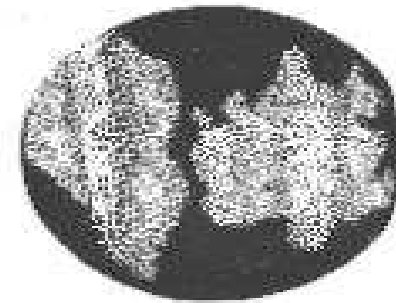
---

# 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 nú – o **microscópio**
  - É neste ponto que se estabelece uma transição do imensamente grande, para o infinitamente pequeno
-

# Origem e Evolução do Microscópio

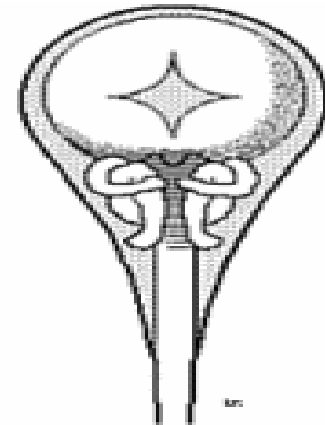
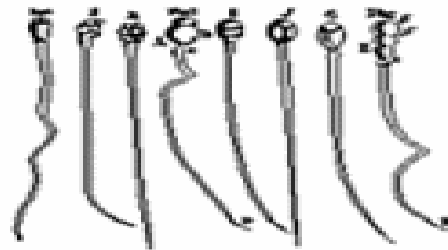
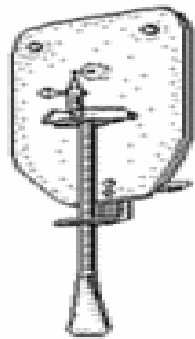
- Em 1595, os irmãos holandeses Francis e Zacharias Janssen, construíram o 1º microscópio óptico composto
- Hooke fabricou um microscópio óptico composto bastante mais aperfeiçoado relativamente ao anterior e examinou um pedaço de cortiça
- Nela observou numerosas cavidades microscópicas, às quais chamou “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.<sup>o</sup> 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

---

# Lentes Objectivas

- **Fabricante** – Nome da empresa responsável pela montagem da objectiva
  - **Denominação:**
  - ***Plan*** – apresentam correcção esférica, ou seja, todo o campo está em foco
  - ***Achromat*** – possuem correcção cromática para 2 cores
  - ***Apochromat*** – possuem correcção cromática para 4 cores
  - ***Fluar*** – possuem fluoreto de cálcio (excelentes para microscopia de fluorescência)
-

---

# Lentes Objectivas

## Classe (segundo Carl Zeiss)

- *LD (long working distance)*- para trabalho com grande distância do espécime, como em culturas de células sob análise em microscópios invertidos
  - *EC (enhanced contrast)* - ideais para fluorescência
  - *LCI (life cell imaging)* - desenhadas para trabalho com células vivas
  - *C (C-Apochromat)* - para microscopia confocal
  - *W ou WN* - desenhadas para aplicações em electrofisiologia
-

---

# Lentes Objectivas

## Magnificação/Abertura Numérica

- A magnificação diz respeito ao n.º de vezes aquela objectiva é capaz de ampliar a imagem da amostra
- Após a barra, consta a abertura numérica (NA), a qual pode ser expressa pela seguinte fórmula:

$$\mathbf{NA = n (\text{sen } \mu)}, \text{ onde:}$$

- n é o índice de refração do meio entre a objectiva e a lamela/amostra
  - b)  $\mu$  é metade do ângulo de abertura da objectiva
  - É importante reparar que, quanto maior a abertura numérica de uma objectiva, mais curta será a sua distância de trabalho
-

---

# Lentes Objectivas - Método de Contraste

- Se a lente contiver um anel de fase no seu interior (destinado à microscopia de contraste de fase), ela indicará *Ph*, seguida de um n.º, o qual varia de acordo com o fabricante
  - Para esse tipo de microscopia, é importante que se observe que este n.º deve ser o mesmo em relação ao indicado no anel que será colocado no condensador
  - A presença desse anel no interior dessas lentes reduz a quantidade de luz por elas transmitida, de maneira que não são habitualmente indicadas para microscopia de fluorescência
  - As inscrições *Pol* e *DIC* se referem à adequabilidade da lente à microscopia de polarização e de contraste de interferência, respectivamente
-

---

# Lentes Objectivas – Meio de Imersão

- As lentes que exigem a utilização de meio de imersão e, portanto, não devem trabalhar com ar entre elas e podem ser:
  - *Oil* - óleo de imersão para microscopia. Este habitualmente tem índice de refração ( $n$ ) próximo a 1,51. Alguns fabricantes produzem óleos especiais, com este mesmo  $n$ , mas especialmente desenvolvidos para uso em microscopia de fluorescência
  - *W* - água. Deve-se empregar água destilada. O uso de óleo de imersão nessas lentes pode danificá-las
  - *Korr* - Essas lentes possuem um anel que as ajusta para o uso com óleo para microscopia, água ou glicerina (*Gly*)
-

---

# 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
-

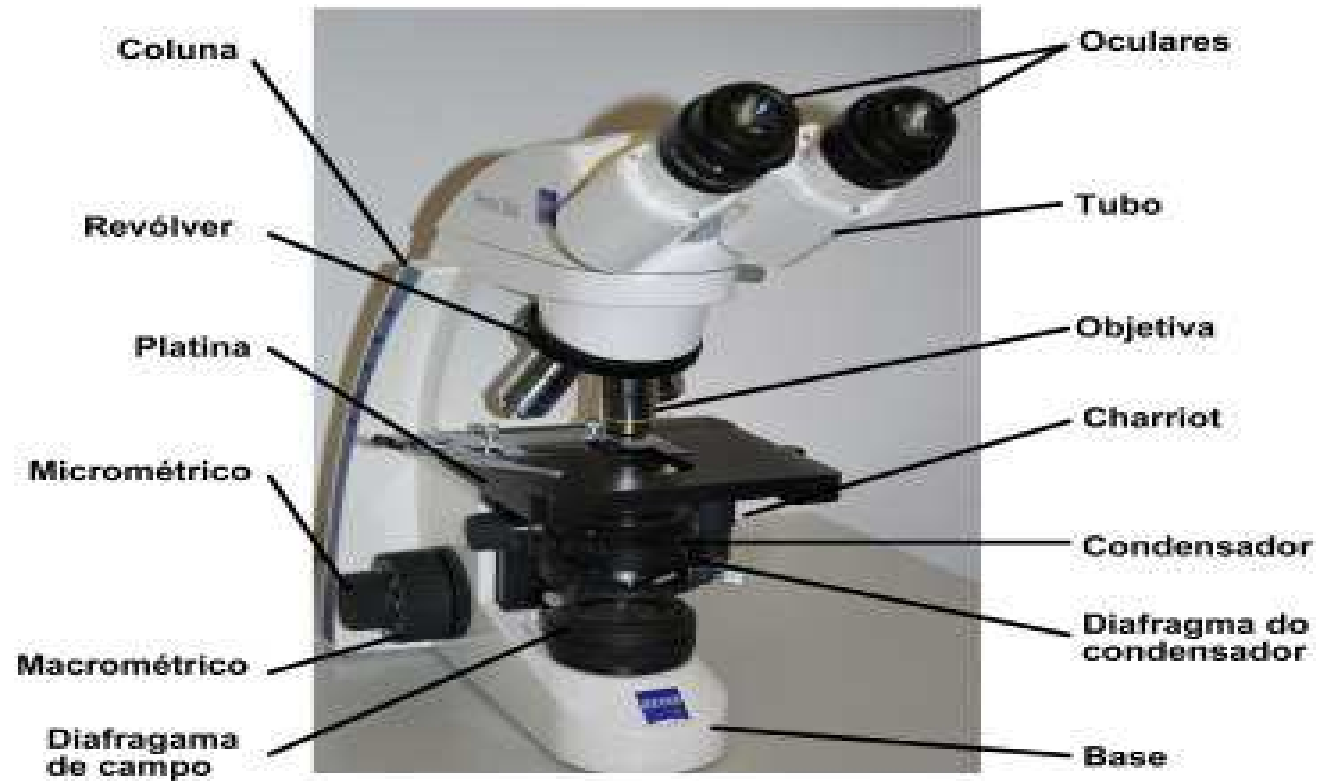
---

# Tipos de Microscopia

- Microscopia de Campo Claro
  - Microscopia Eletrónica
  - Microscopia de Fluorescência
  - Microscopia de Contraste de Fase
  - Microscopia de Fundo Escuro
  - Microscopia Confocal
-

---

# Microscópio Óptico



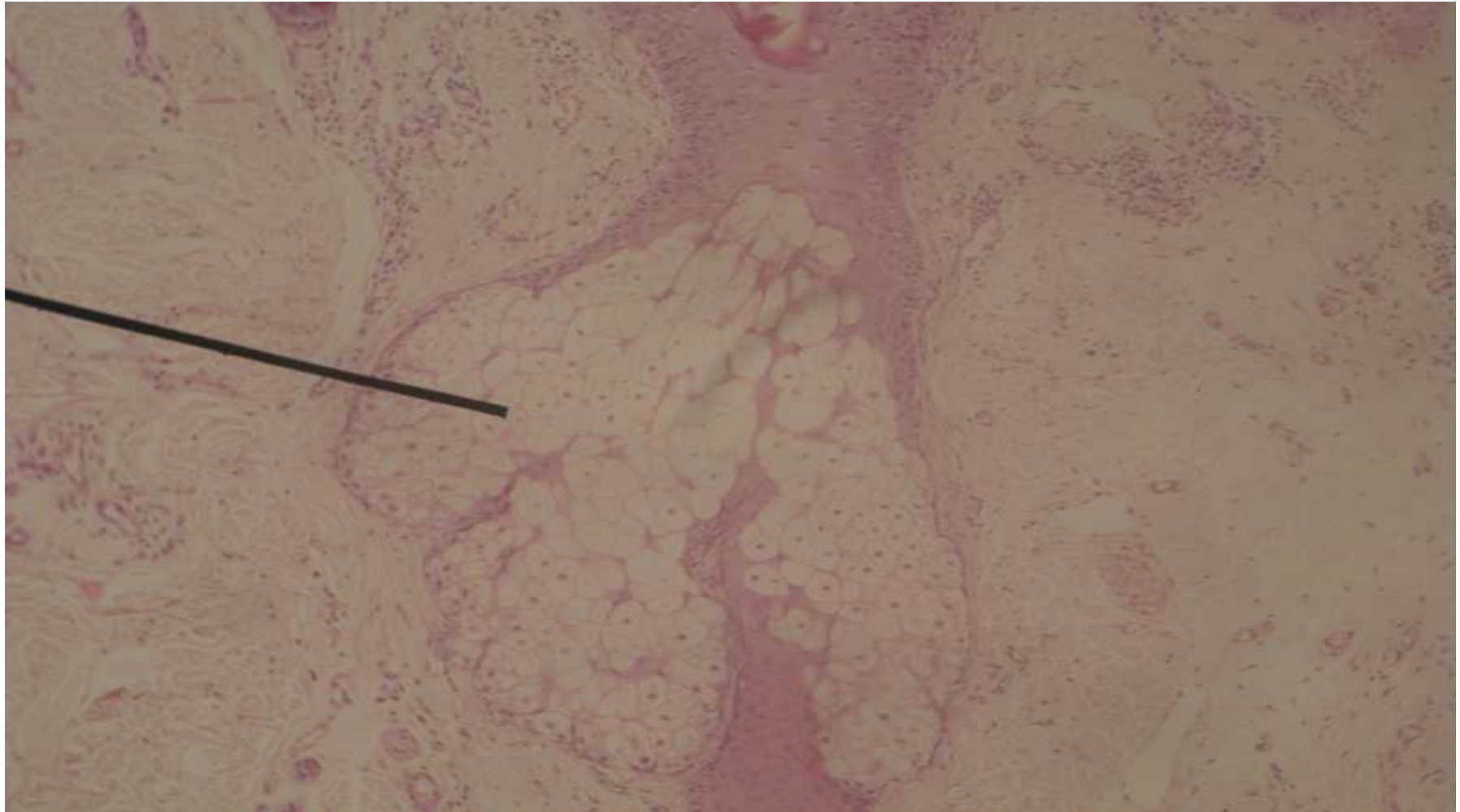
---

# Microscopia de Campo Claro

- Não há interferências no caminho óptico, fundo branco
  - A luz parte da fonte luminosa, é concentrada pelo condensador, interage com a amostra e é colectada pela objectiva
  - A imagem ampliada pela objectiva é formada na lente do tubo e mais uma vez ampliada pelas oculares, até chegar ao observador
  - É necessário que a amostra possua cor própria ou que esta lhe tenha sido conferida artificialmente
  - A cor permite um maior contraste entre as estruturas que possibilita sua correcta observação
-

---

# Imagem de Microscopia de Campo Claro



---

# Microscopia Electrónica

- 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
-

---

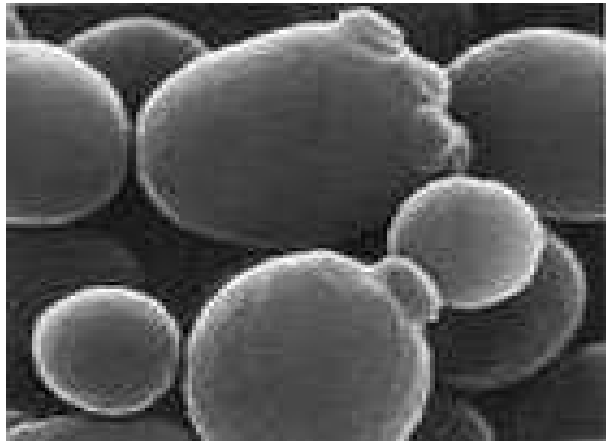
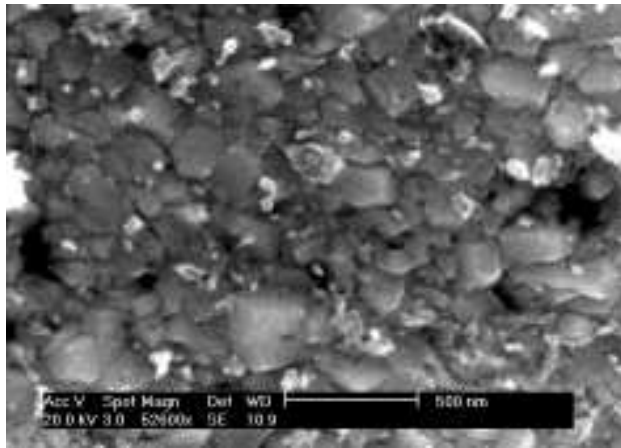
# Microscópio Electrónico de Varrimento

- 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 Eletrônico



# Imagens de Microscópio Electrónico de Varrimento

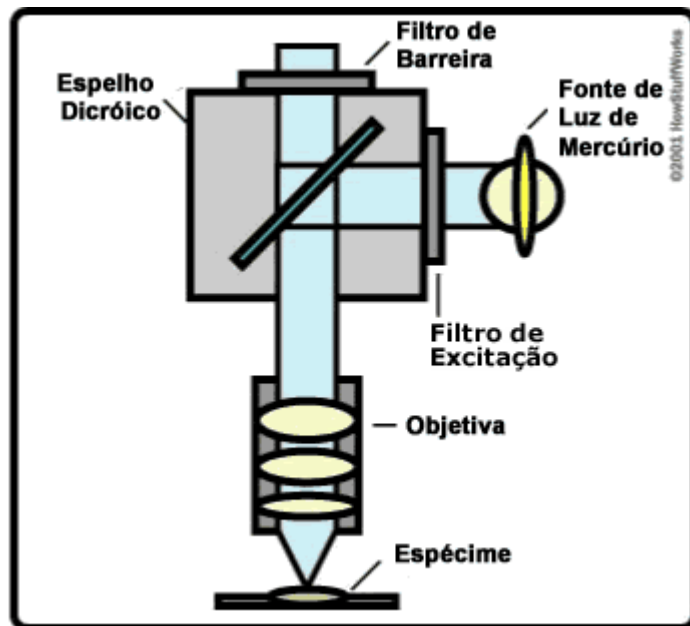


---

# Microscopia de Fluorescência

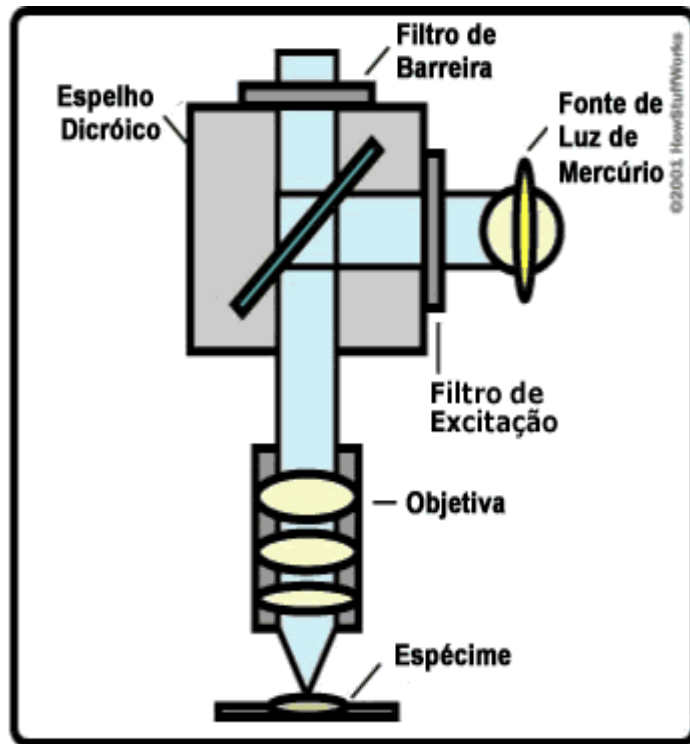
- Algumas substâncias apresentam propriedade fluorescente, ou seja, quando excitadas, com uma determinada fonte de energia, emitem luz. Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez pelo cientista inglês George G. Stokes, ao trabalhar com um mineral que apresentava essas propriedades
  - A fluorescência ocorre quando elétrons de uma molécula são excitados e mudam de camada eletrônica, passando a ocupar uma camada mais energética
  - Estes elétrons voltam a seu estado original emitindo luz. A luz emitida apresenta energia menor que a recebida durante a excitação. Isso se deve a uma ligeira perda de energia sob a forma de calor
-

# Microscopia 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 dicróico** - espelho que reflecte c.d.o. de um determinado intervalo e permite que c.d.o. de outro intervalo passe através dele
- O espelho dicróico reflecte a luz ultravioleta até o espécime

# Microscopia de Fluorescência



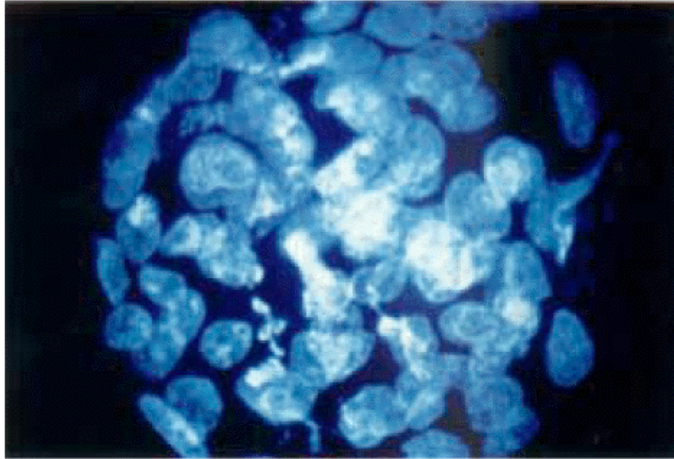
- A luz UV excita a fluorescência dentro das moléculas da amostra
- A objetiva recolhe a luz de c.d.o. fluorescente que foi produzida
- Esta luz fluorescente passa através do espelho dicroico e de um filtro de barreira (capaz de eliminar outros c.d.o. além do fluorescente), levando-a para formar a imagem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

---

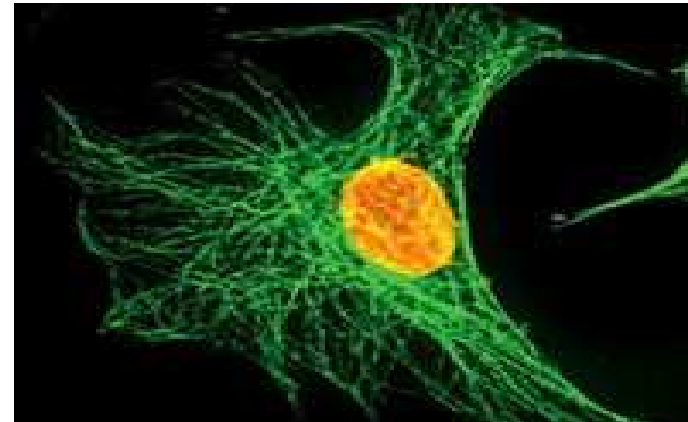
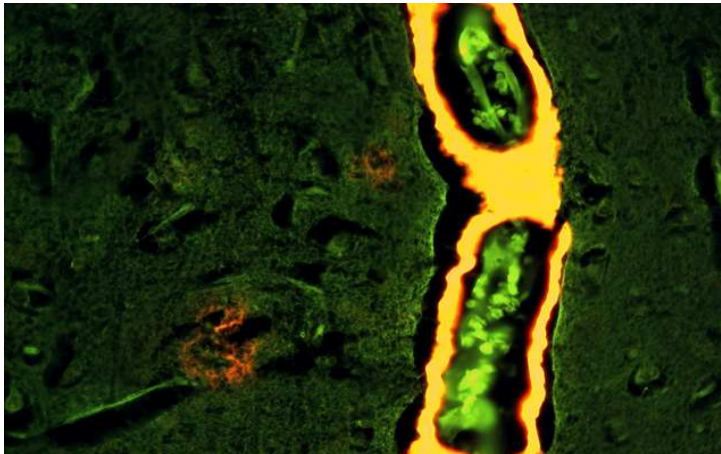
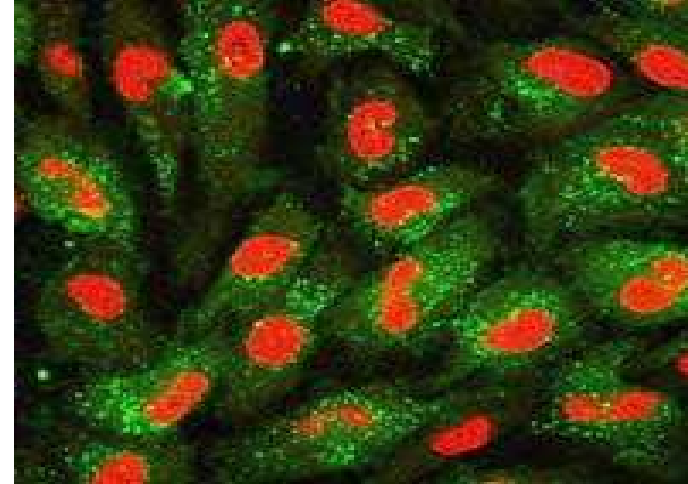
# Microscópio de Fluorescência



# Imagens de Microscopia de Fluorescência



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



---

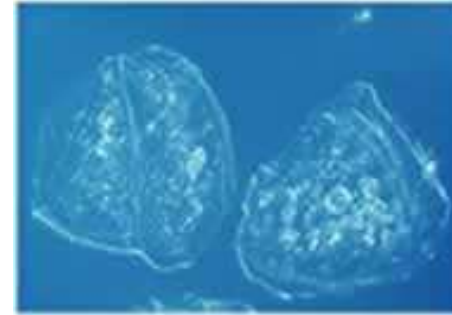
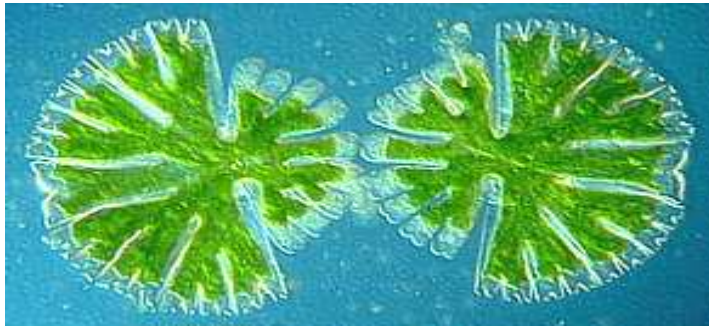
# Microscopia de Contraste de Fase

- Algumas amostras são observadas ao microscópio sem coloração, p.e. células em cultura
  - Para observação de amostras muito finas que não podem ser coradas, deve-se utilizar técnicas microscópicas de alto contraste
  - Baseia-se no atraso que raios difractados apresentam em relação a raios não difractados
  - Essa diferença pode ser eliminada se os raios que não foram difractados forem acelerados ou retardados
  - Para tal, utiliza-se um anel de fase no condensador e na objectiva, que une os raios difractados e os não difractados, aumentando assim as interacções positivas e negativas entre estes raios e, conseqüentemente, o contraste da imagem
-

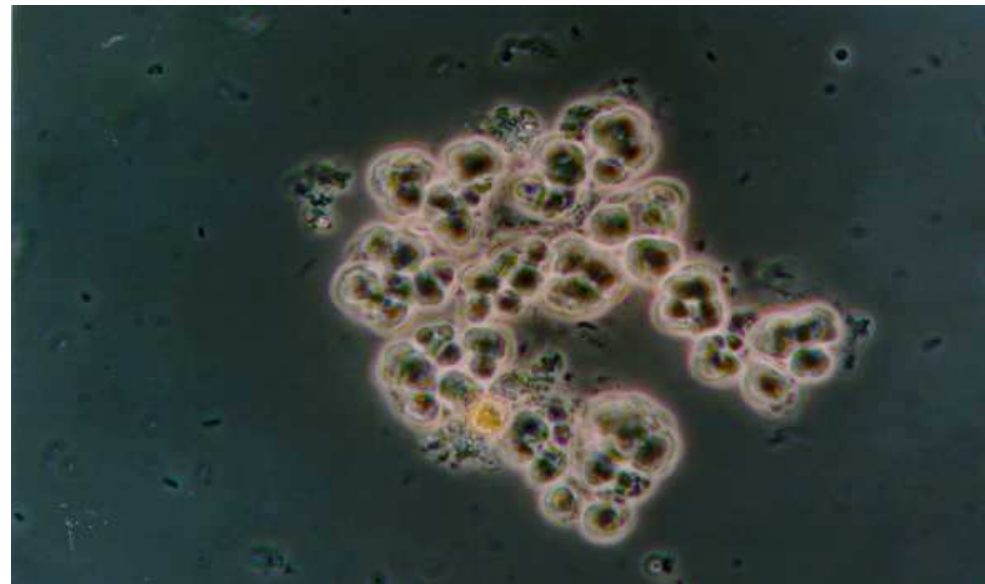
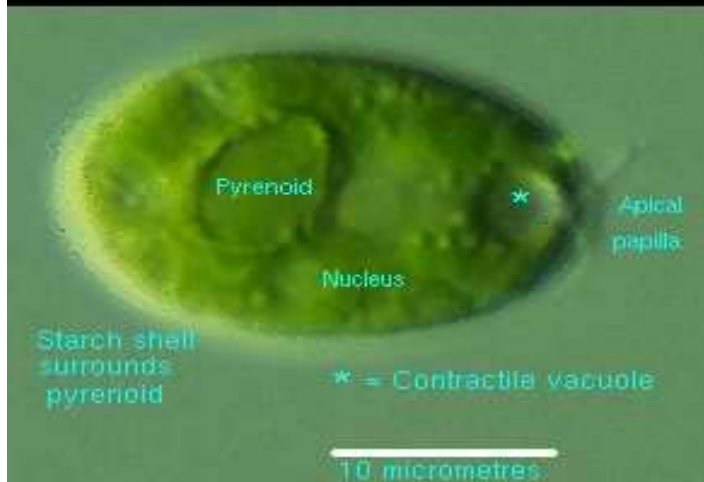
# Microscópio de Contraste de Fase



# Imagens de Microscopia de Contraste de Fase



***Chlamydomonas moewusii***  
Gerloff



---

# Microscopia 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

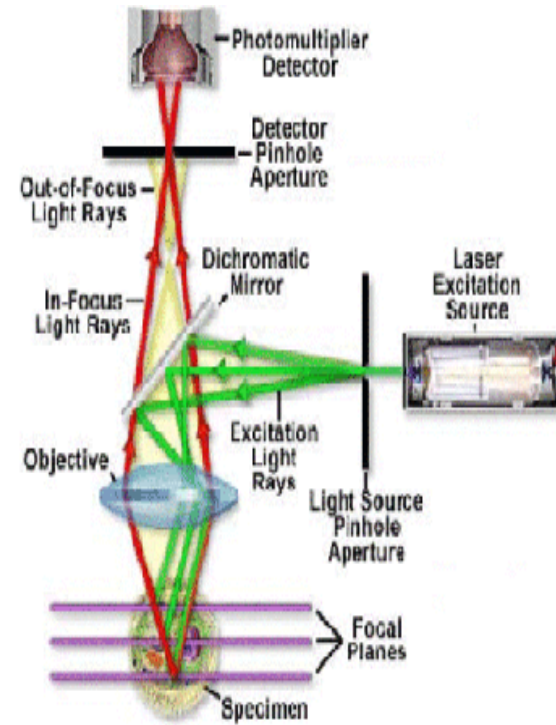


---

# Microscopia Confocal

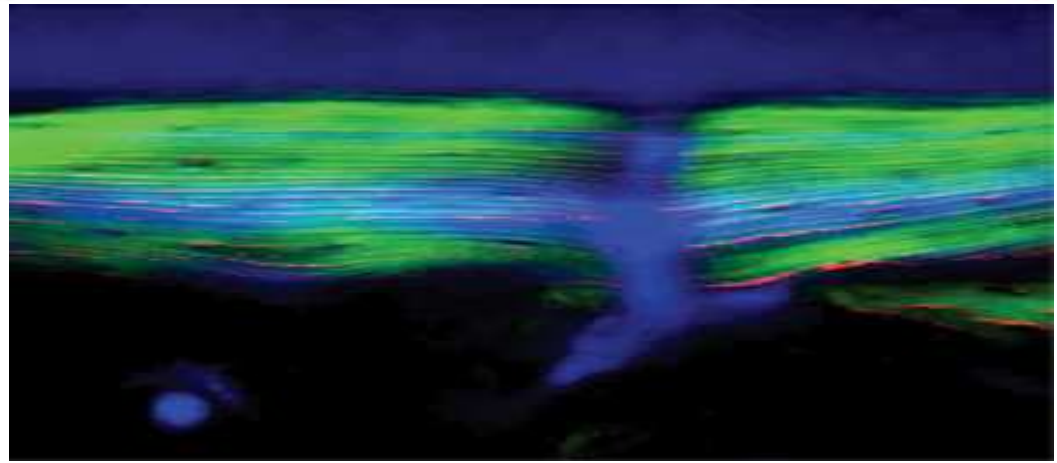
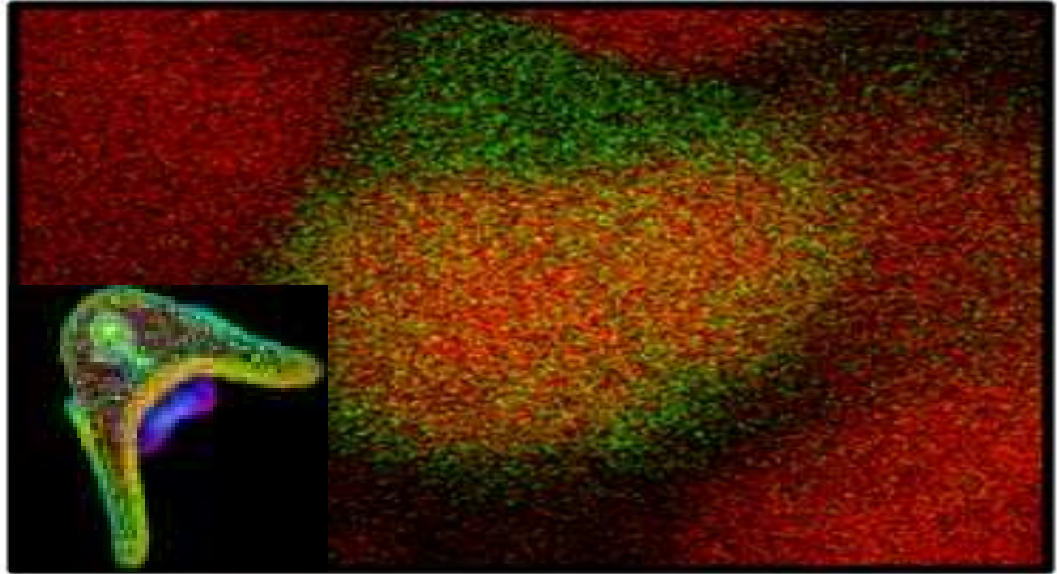
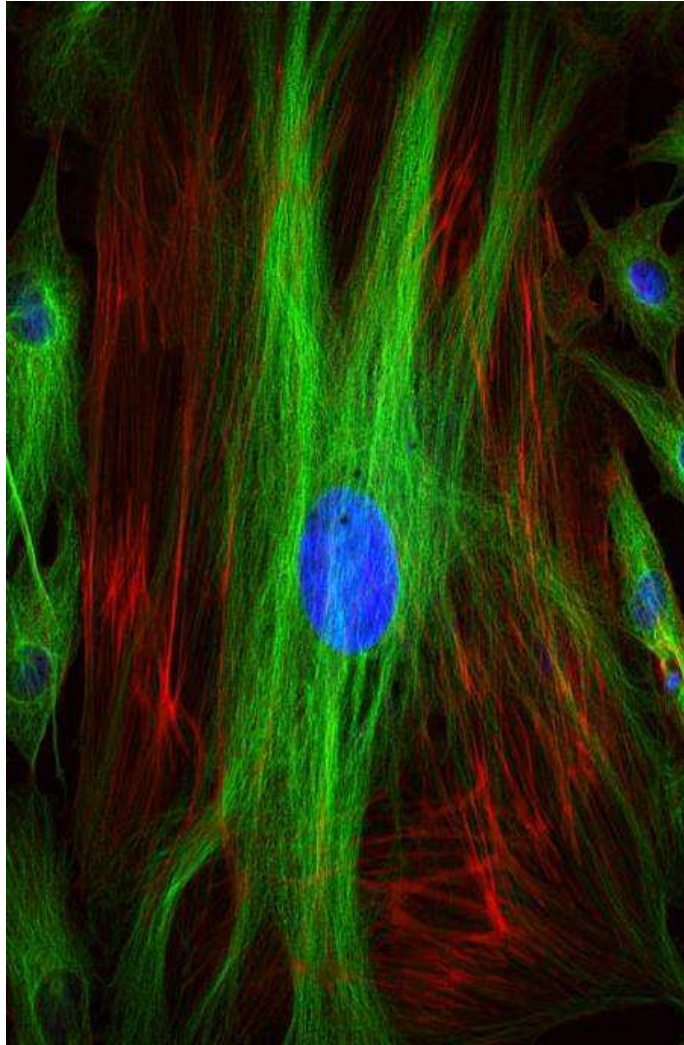
- O **microscópio confocal** permite visualizar imagens de diferentes planos do objecto a faz a sua sobreposição
  - Possibilita a criação de imagens tridimensionais
  - Funciona com raios laser que visualizam um único plano de cada vez, de modo a não haver sobreposição de imagens
  - Esta capacidade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