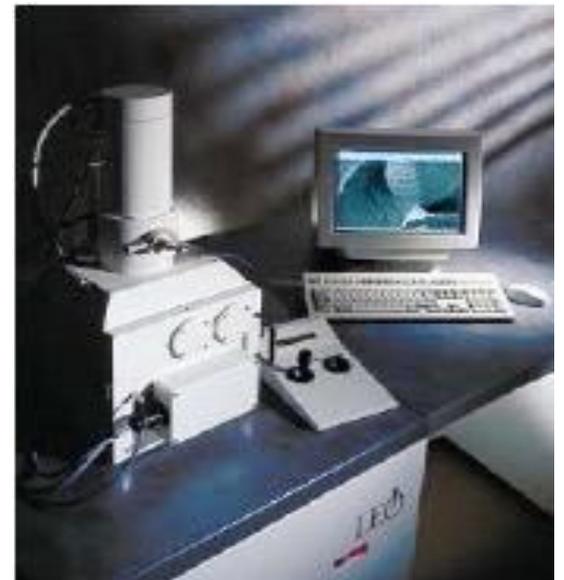
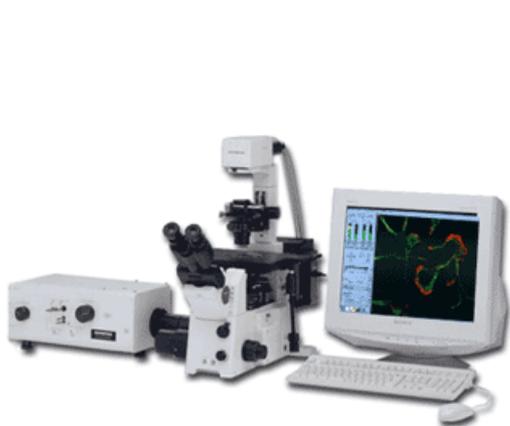
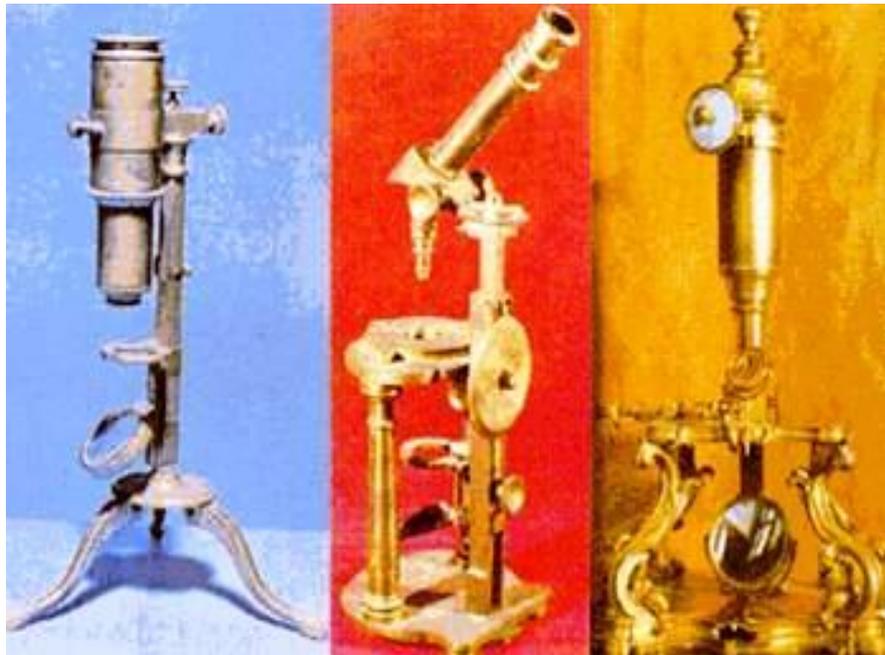




# MICROSCOPIA

Prof<sup>a</sup> Marta Gonçalves Amaral, Dra.



# HISTÓRICO

- Século XIV: uso lentes para correção da visão

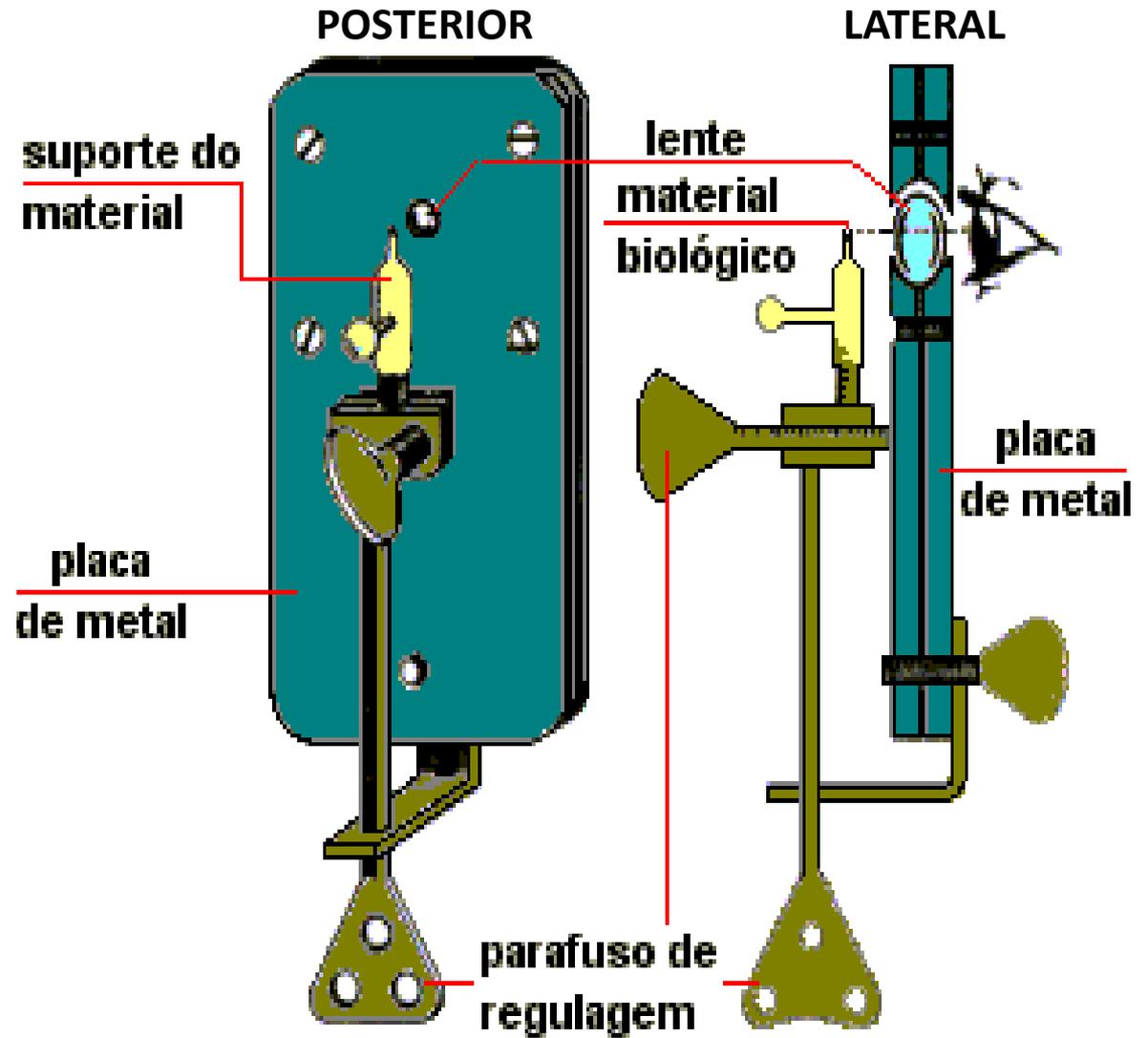
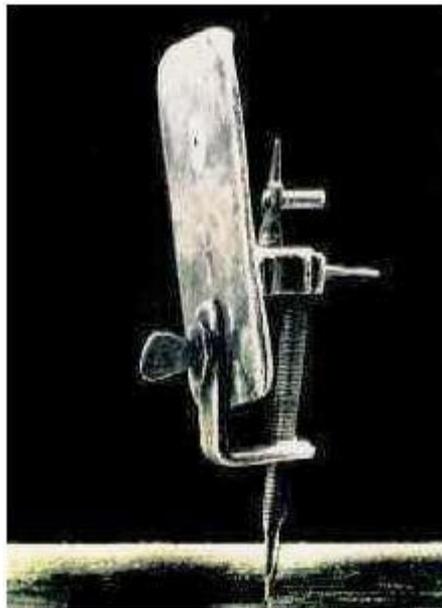


- Galileu no século XVI criou a lupa



- Século XVI o holandês Antonie van Leeuwenhoek ("lêiven-ruk") criou o primeiro microscópio

# Microscópio de Leeuwenhoek



- **Século XVII o microscópio composto foi criado pelo holandês Zacharias Janssen.**

## **2 lentes convergentes**

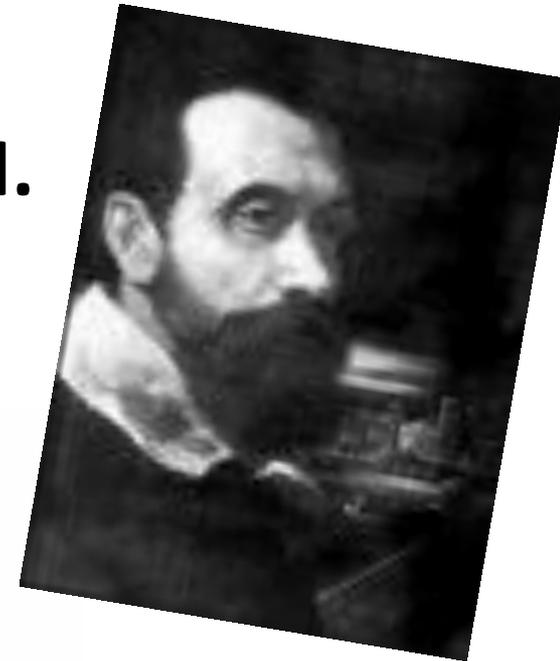


- O nome "microscópio" surgiu em 1624, sugerido por Johann Giovanni Faber de Bamberg; médico, vivia em Roma, membro da *Accademia Nazionale dei Lincei* e trabalhava para o papa Urbano VII.

- São dois vocábulos de origem grega:

Micros = pequeno

Skopein = ver, examinar





**Em 1655 Robert Hook  
descreve os poros da  
cortiça denominado de  
células**



# Unidades e medidas em microscopia

**MO= micrômetro ( $\mu\text{m}$ )**

**ME= nanômetro ( $\text{nm}$ ) e angstrom ( $\text{\AA}$ )**

$$1 \mu\text{m} = 10^{-3}\text{mm} (0,001\text{mm}) = 10^{-6}\text{m}$$

$$1 \text{nm} = 10^{-3} \mu\text{m} = 10^{-6}\text{mm} (0,000001\text{mm}) = 10^{-9}\text{m}$$

$$1 \text{\AA} = 10^{-1} \text{nm} = 10^{-4} \mu\text{m} = 10^{-7} \text{mm} (0,0000001\text{mm}) = 10^{-10}\text{m}$$

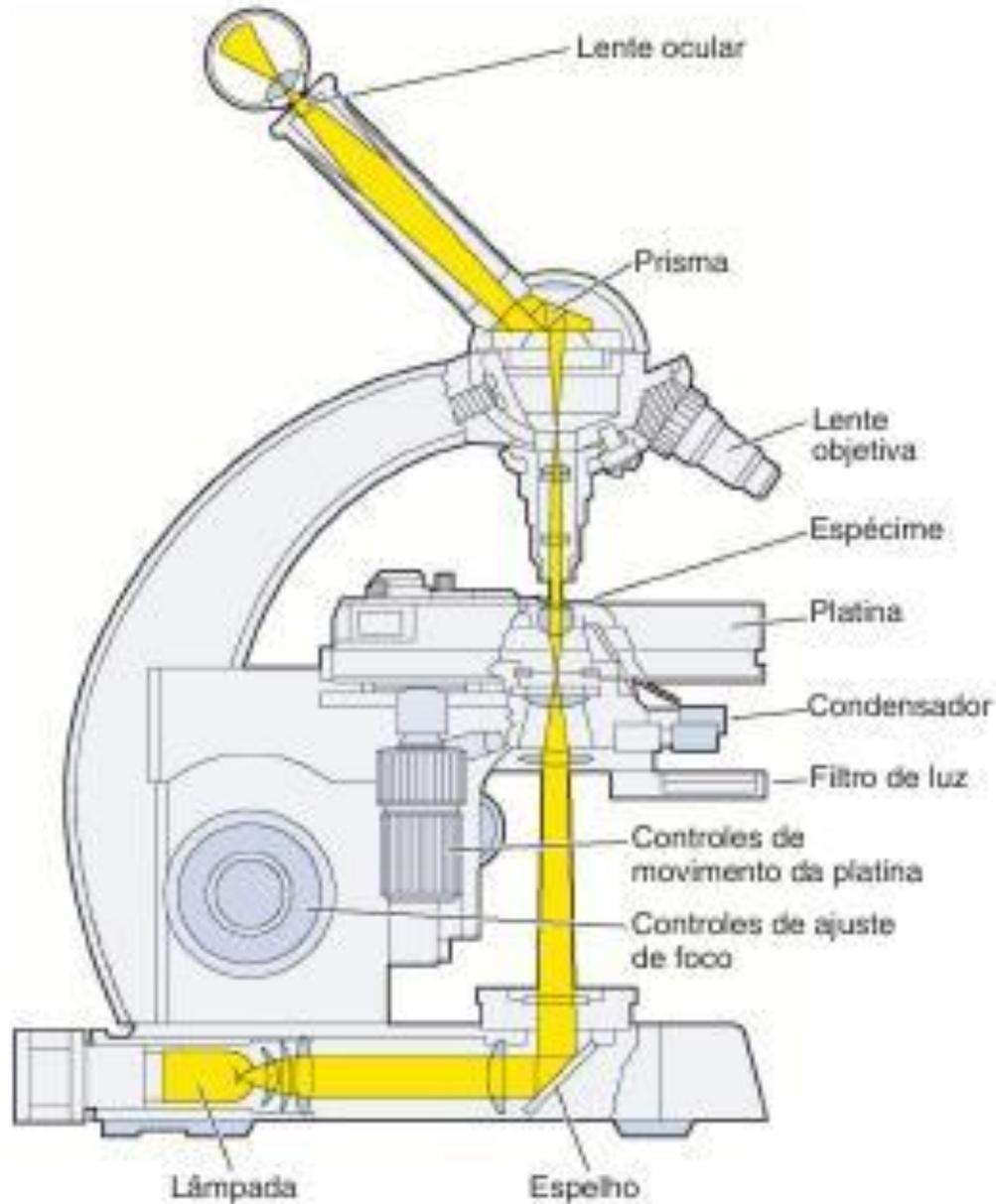
# **Microscópio óptico ou composto**

## **Microscópios ópticos mais usados**

- 1. Microscópio de luz**
- 2. Microscópio de campo escuro**
- 3. Microscópio de contraste de fase**
- 4. Microscópio de contraste interferencial**
- 5. Microscópio de polarização**
- 6. Microscópio de fluorescência**
- 7. Microscópio confocal a *laser***

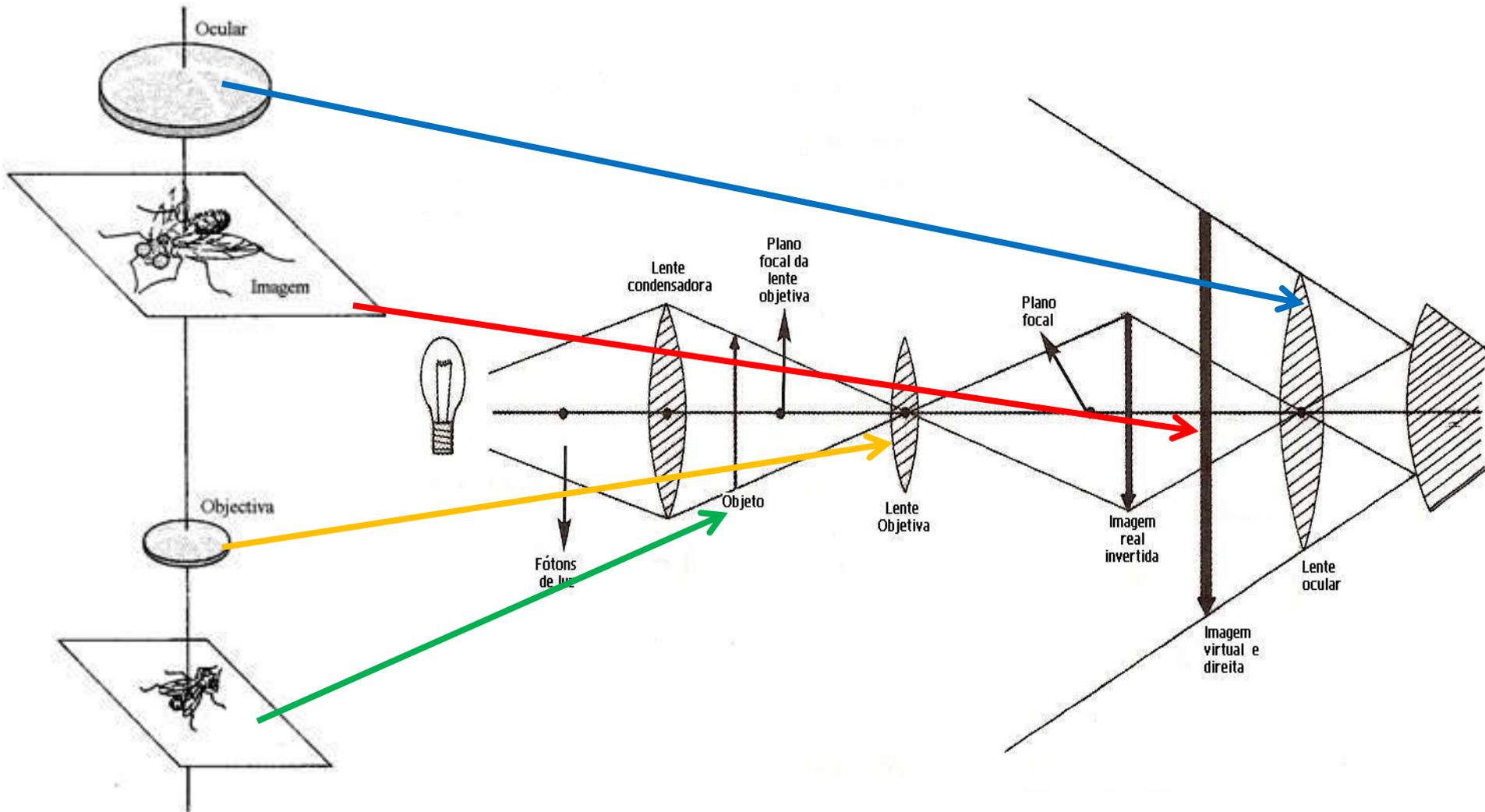
# Microscópio de luz

M  
E  
C  
Â  
N  
I  
C  
A



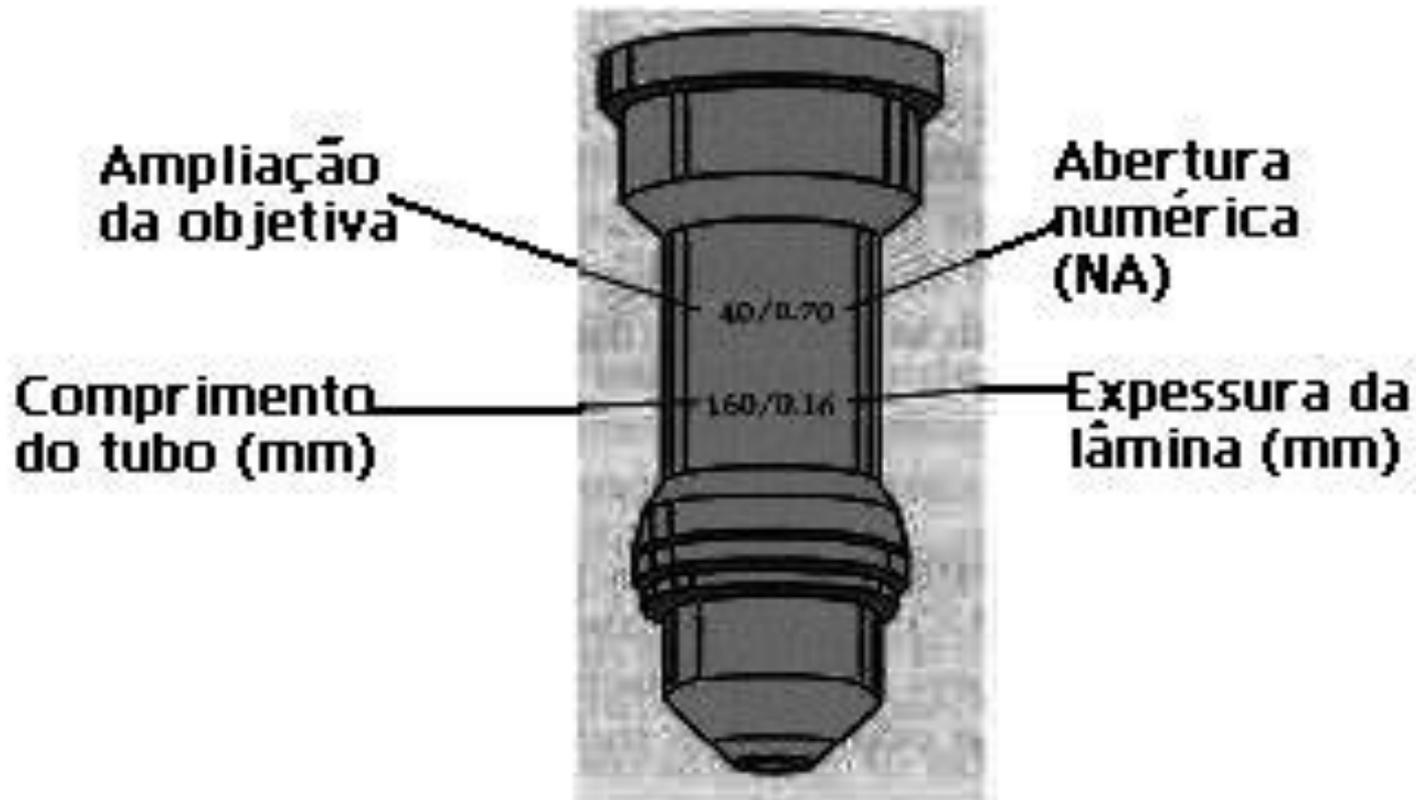
Ó  
P  
T  
I  
C  
A

# Formação da imagem



# Ampliação

**OBJETIVA x OCULAR = AMPLIAÇÃO**



**Inscrições nas objetivas**

# Poder de resolução

**PODER DE RESOLUÇÃO:** é o mais importante,  
**SÃO OS DETALHES QUE PODEMOS OBSERVAR**

**PR**  comprimento de onda da luz ( $\lambda$ )  
abertura numérica da objetiva (NA)

**LIMITE DE RESOLUÇÃO:** menor distância entre 2 pontos, percebida pelo olho humano que é 0,1mm ou  $10^{-1}\mu\text{m}$

**LR é inversamente proporcional ao PR**

**Quanto < o LR da lente  
> é o PR do microscópio**

$$LR = K \frac{\lambda}{AN}$$

**K**= uma constante avaliada em 0,61

**$\lambda$** = comprimento de onda da radiação

**AN**= abertura numérica

$$AN = n \times \text{sen} \alpha$$

$n$  = índice de refração do espaço entre a preparação e a objetiva

$\text{sen } \alpha$  = seno do semi-ângulo de abertura da objetiva

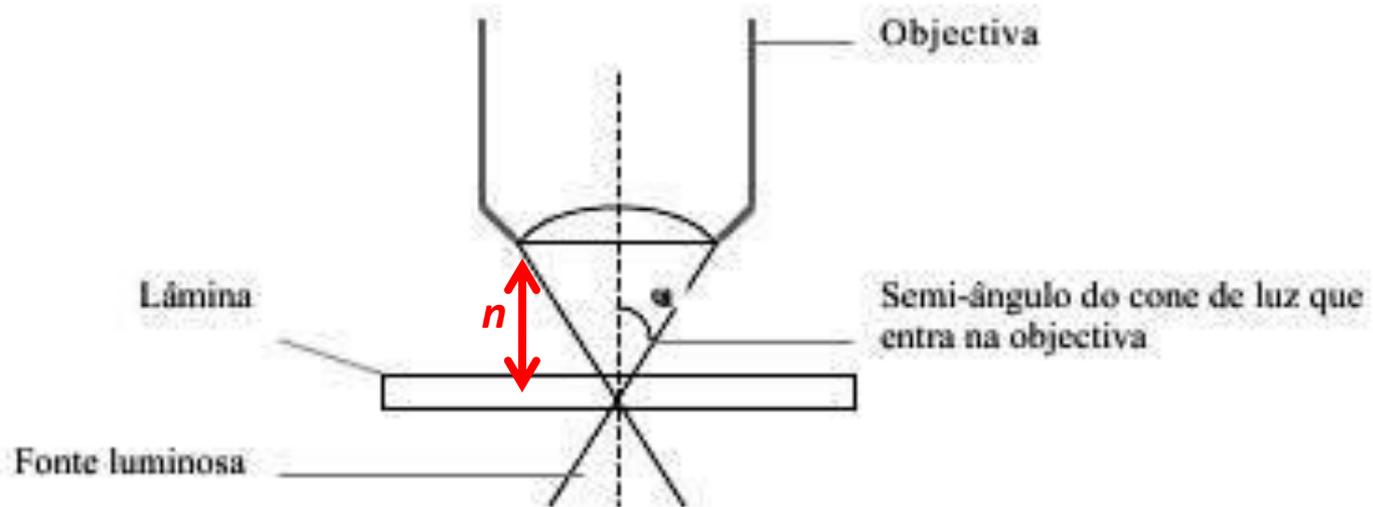


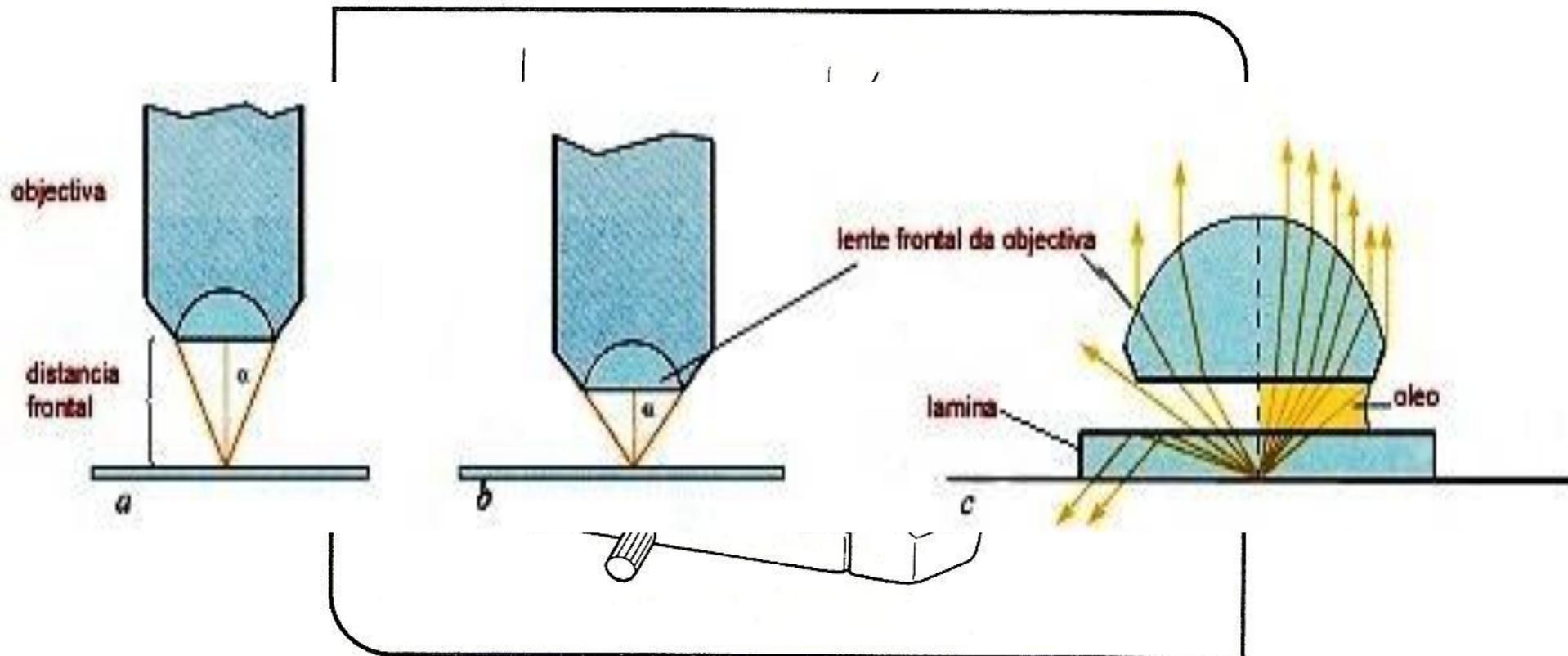
Fig. 4 – Semi-ângulo de abertura da objetiva ( $\alpha$ ).

Índice de refração: razão entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da radiação no meio considerado

# Objetiva de imersão

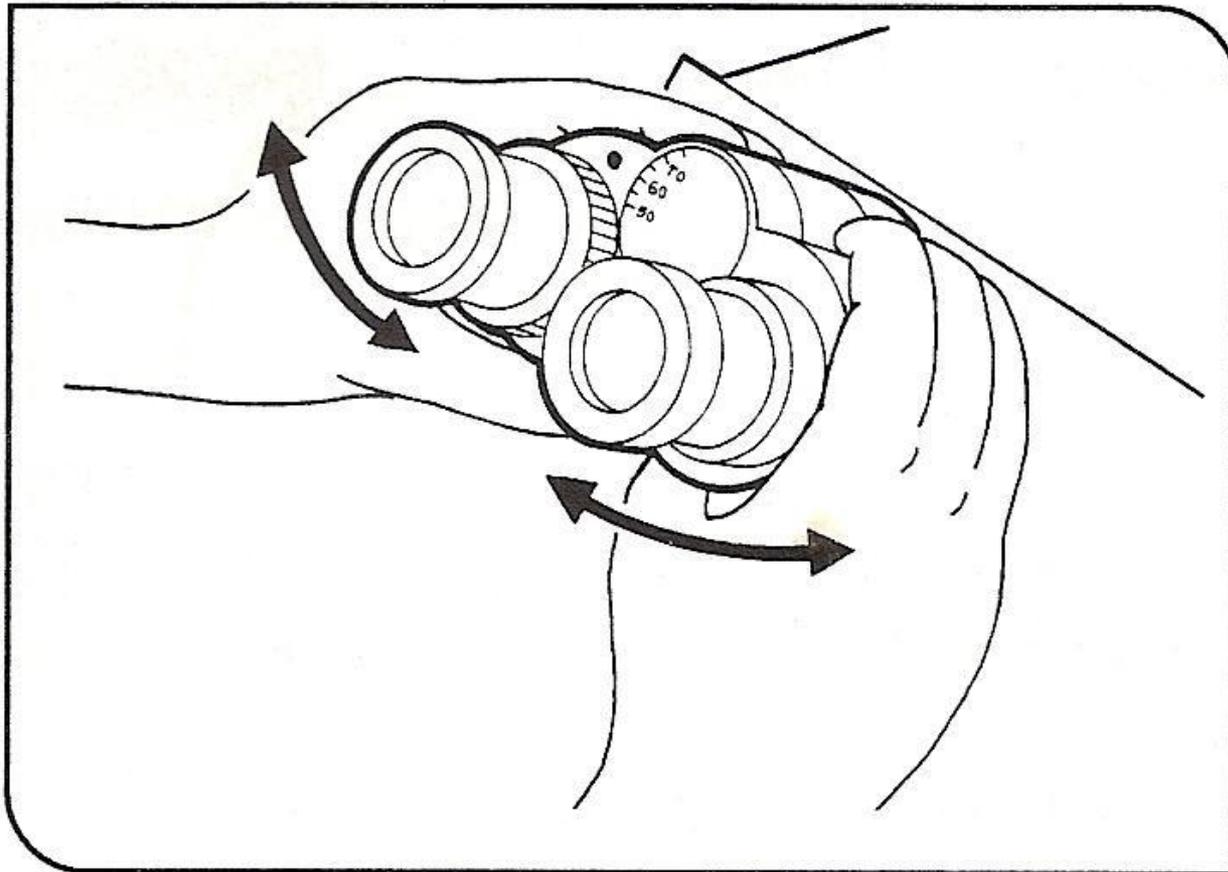
**Óleo de imersão:** tem IR (1,5) semelhante ao vidro

**Função:** evitar a dispersão dos raios luminosos, que atravessam a “lâmina-óleo”, permitindo a entrada de um grande cone de luz na objetiva.



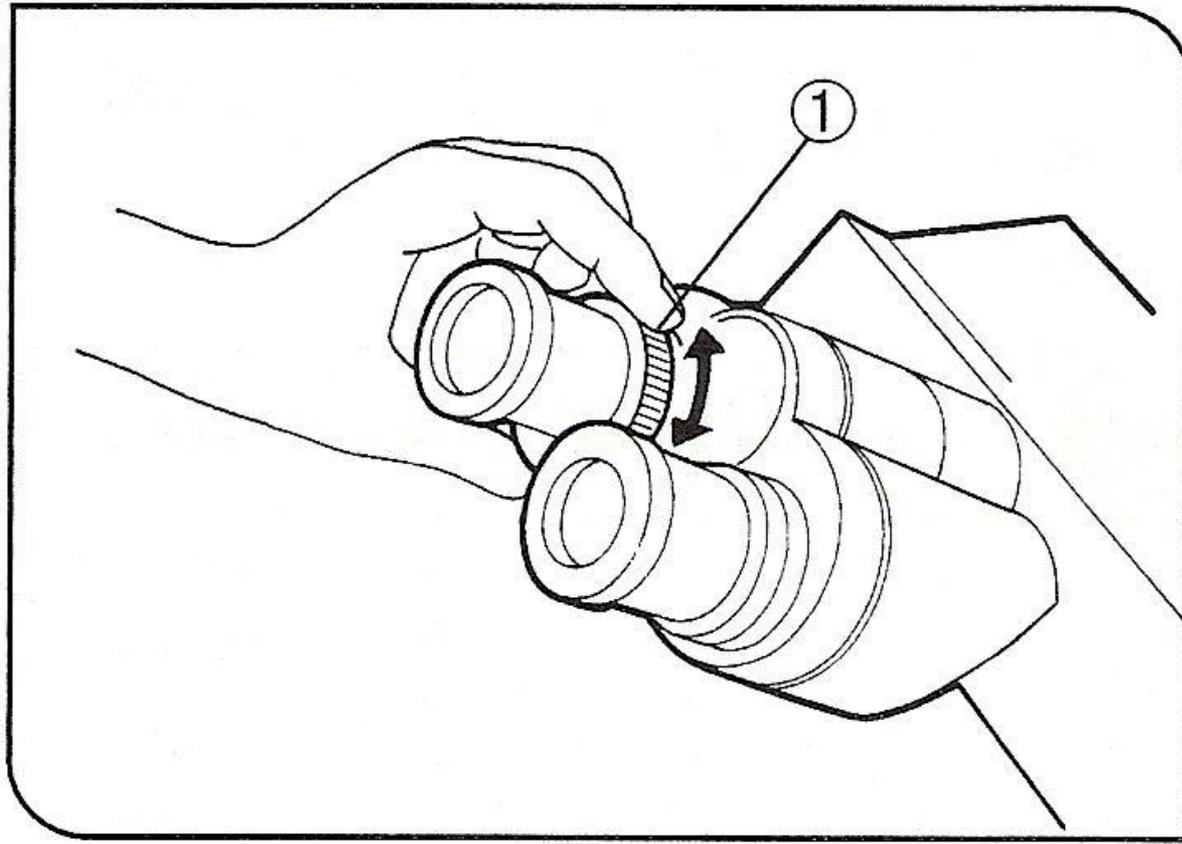
# Distância ocular

Deve ser ajustada de acordo com a distância inter-pupilar do observador

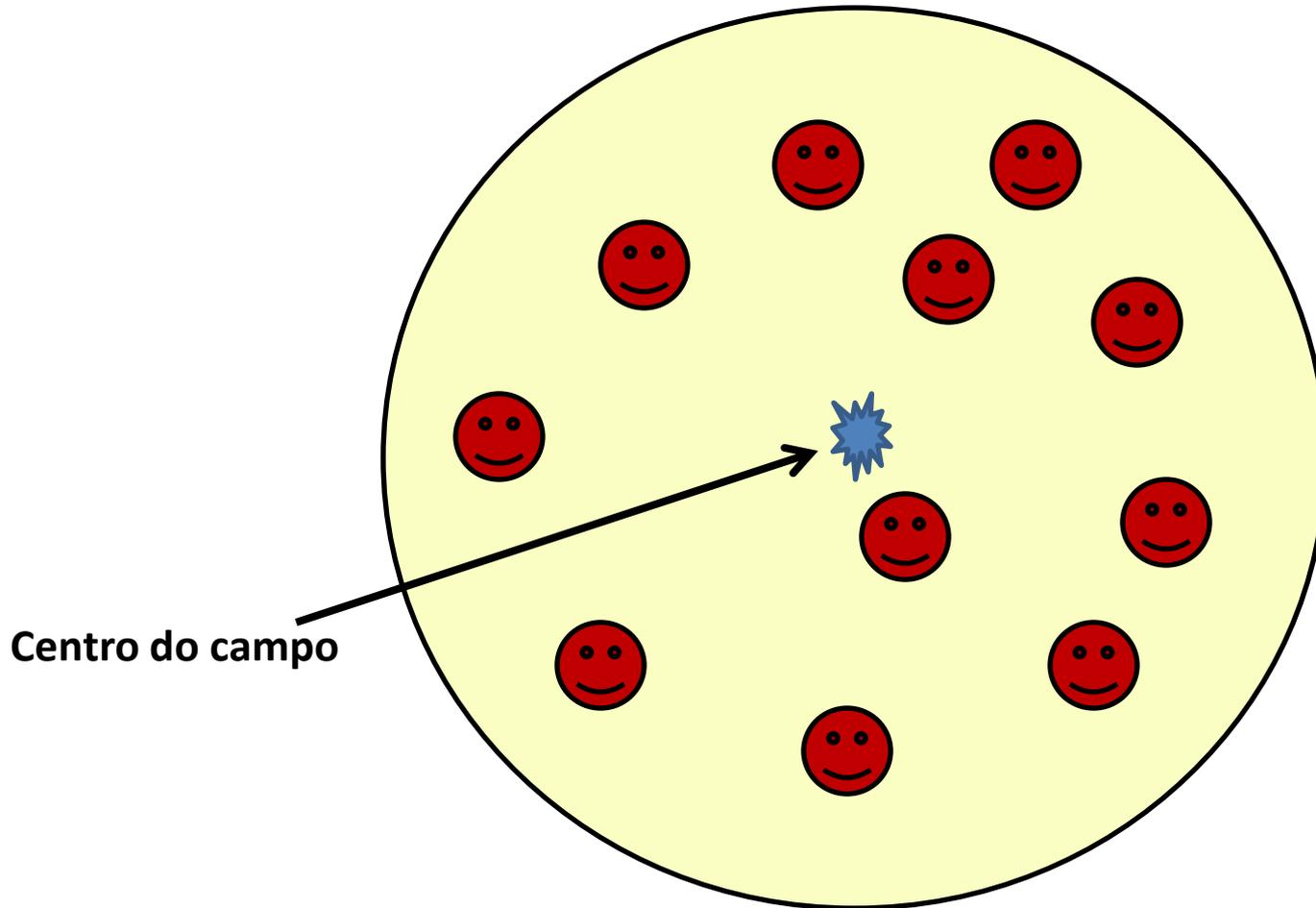


# Ajuste da dioptria

**Dioptria:** popularmente conhecido como *grau*, este ajuste permite corrigir o foco de acordo com a acuidade visual de cada um.



# CAMPO MICROSCÓPICO



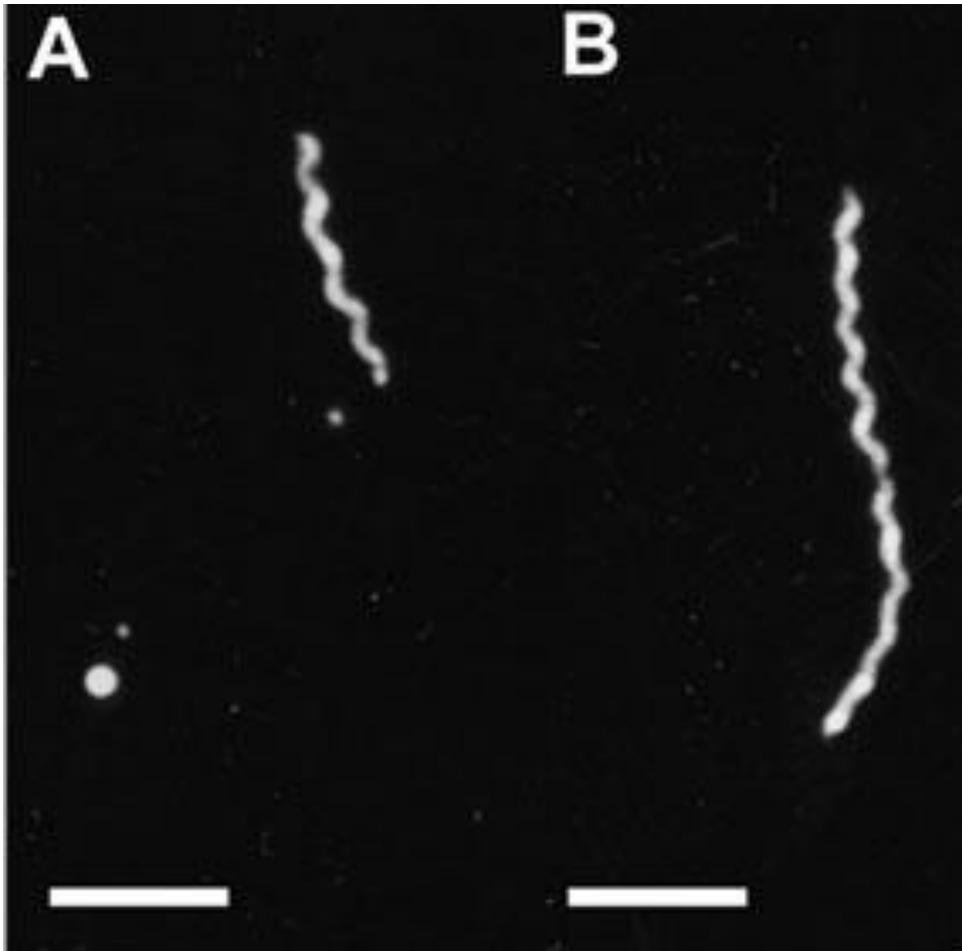
# Cuidados com o microscópio

1. Transporte o microscópio na posição vertical, com as 2 mãos, uma segurando no braço e a outra apoiando a base.
2. **NUNCA** toque nas lentes oculares e objetivas!
3. Não arraste o microscópio na bancada.
4. Limpeza das lentes com pano limpo, macio e seco, que não solte fibras, se necessário usar álcool-éter (v/v)
5. Ao final da observação, diminuir a intensidade luminosa, desligar a lâmpada, baixar a mesa e girar o revolver com a menor objetiva para baixo.

# Microscópio de campo escuro

- É usado um condensador especial que inclina a luz, ela não atravessa o objeto estudado.
- A luz é dispersa pela superfície dos materiais que tem diferentes índices de refração, capaz de fazer com que somente os raios luminosos que atingirem um objeto na lâmina entrem na objetiva
- Quando a luz atinge o objeto ela desvia pelo resto do sistema (objetivas e oculares) formando a imagem.
- **Usado para o estudo de material não corado suspensos em líquidos: bactérias, plâncton, etc.**





*Treponema denticola* figura 1 A e B  
(barra = 5  $\mu\text{m}$ ) microscopia de campo escuro  
patógeno periodontal

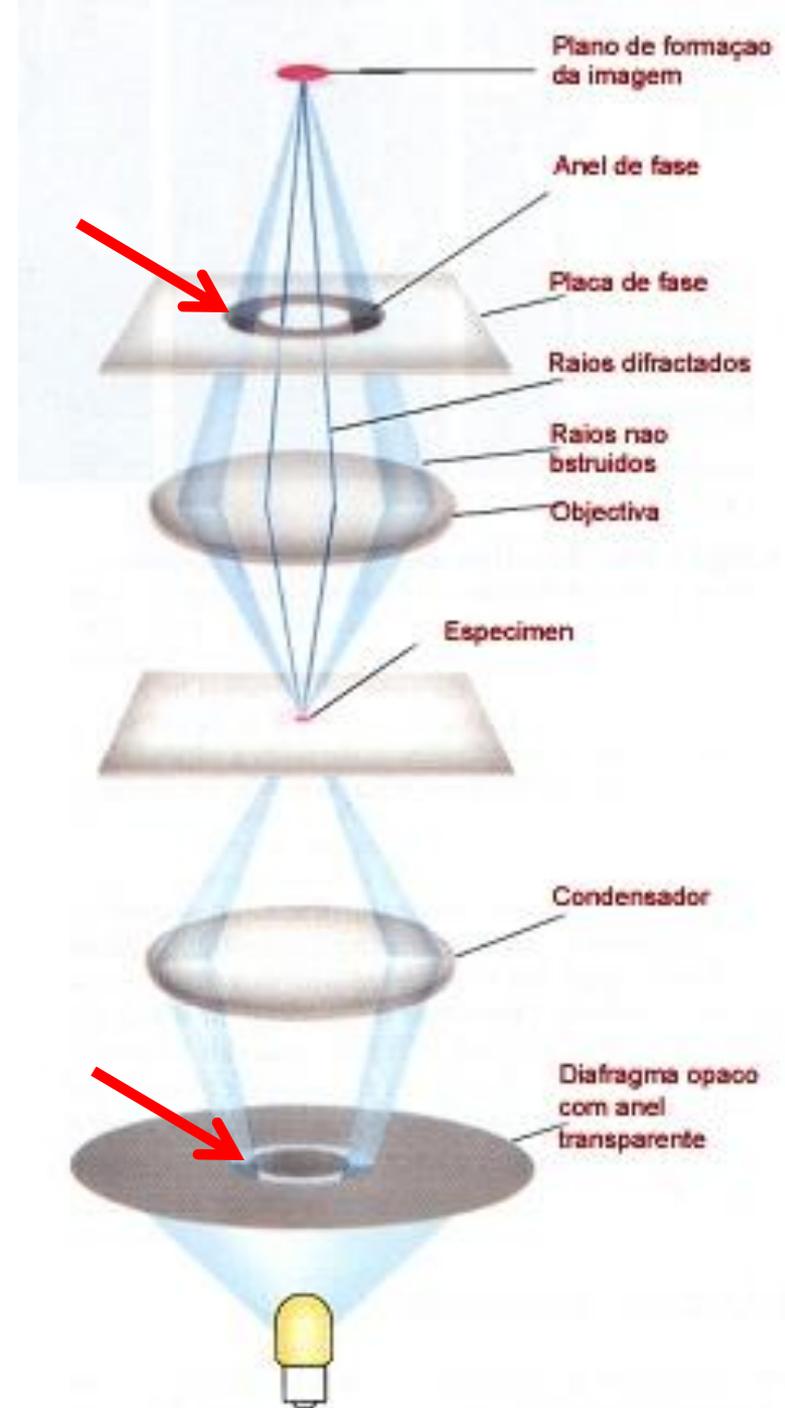


Trofozoíto no LCR  
microscopia de campo escuro  
1000X

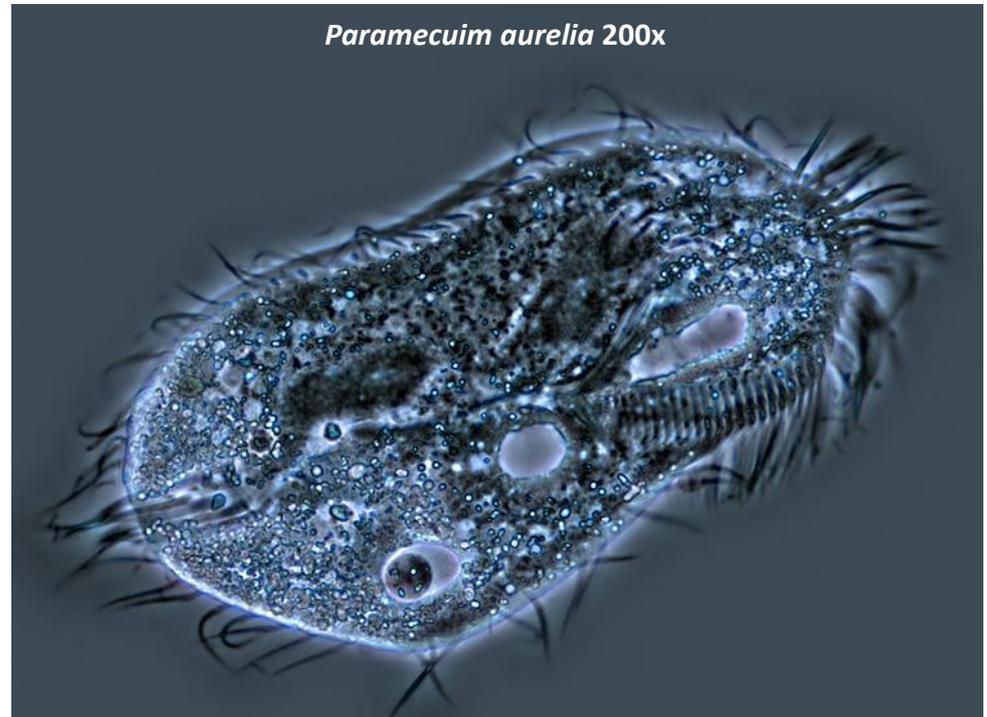
# Microscópio de contraste de fase

- Desenvolvido em 1950 pelo holandês Zerniké
- É baseado na difração da luz
- O caminho do **feixe luminoso na formação da imagem sofre um retardo óptico**, permitindo a visualização de materiais biológicos sem coloração

O retardo óptico da luz é feito por **2 anéis metálicos** colocados no caminho da luz, um no condensador e outro nas objetivas (*Ph*)

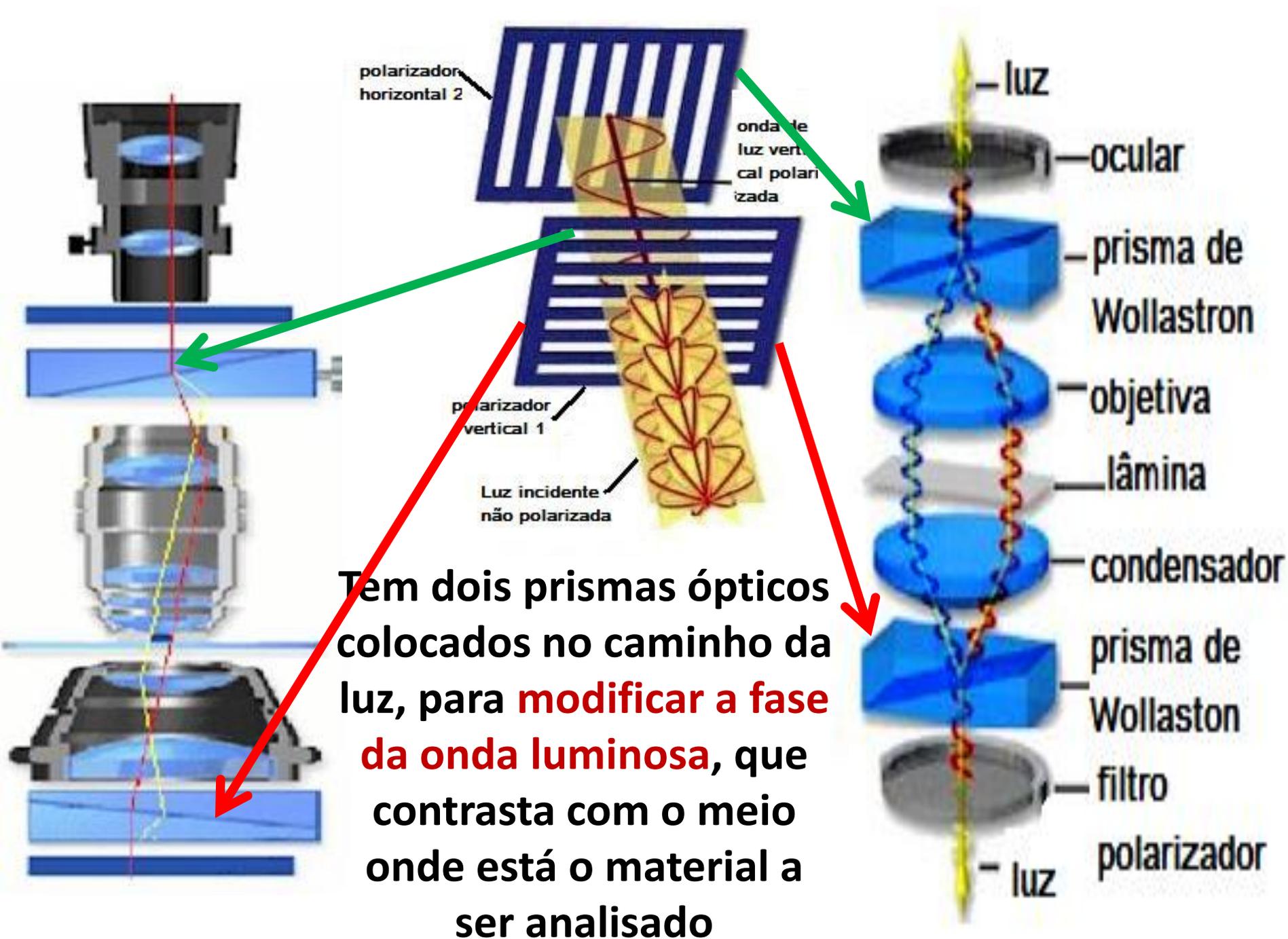


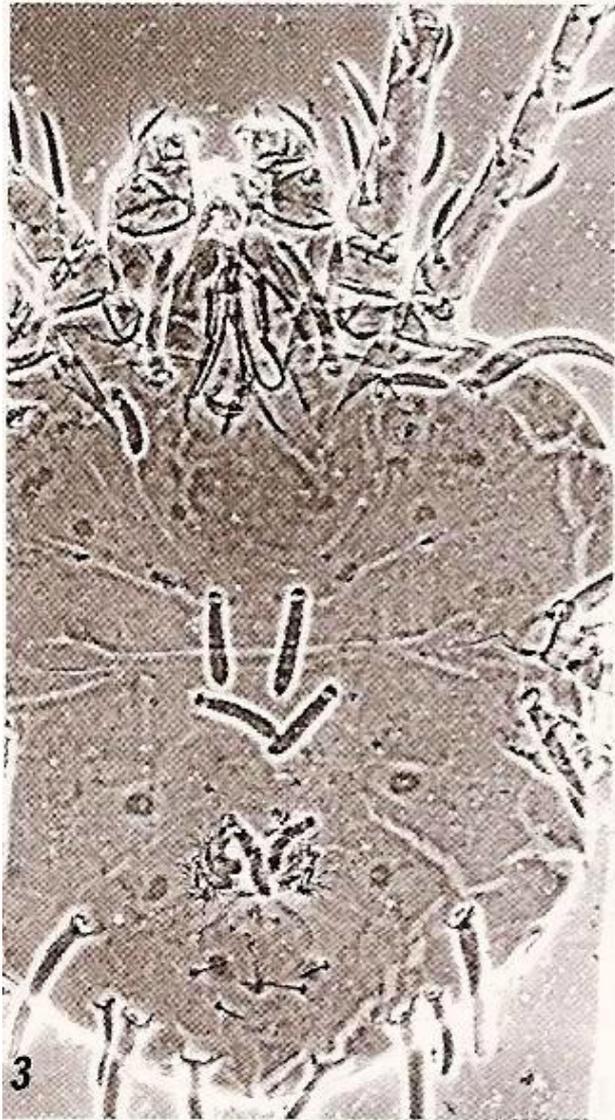
# Usado para estudo de células vivas, bactérias, algas , protozoários, etc.



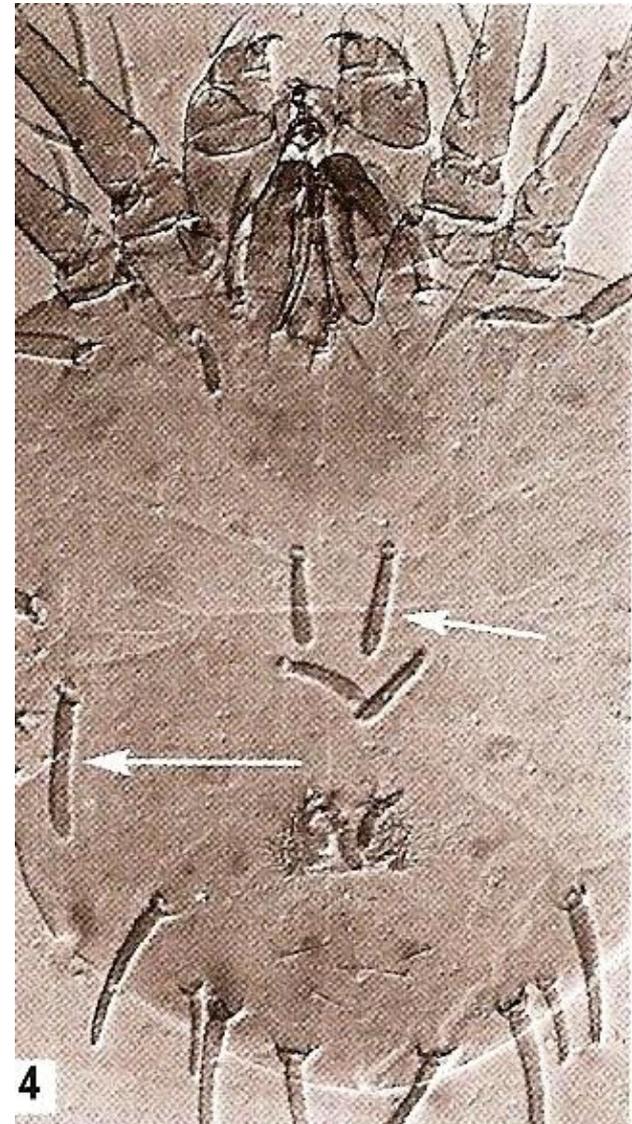
# Microscópio de contraste interferencial/ Nomarski

- O microscópio de Nomarski é o interferencial mais conhecido, **permite o aumento do relevo das superfícies do objeto analisado.**
- **Usado em materiais não corados como cultura de células e parasitologia**





Contraste de fase: ácaro  
*Aponychus chiavegatoï*

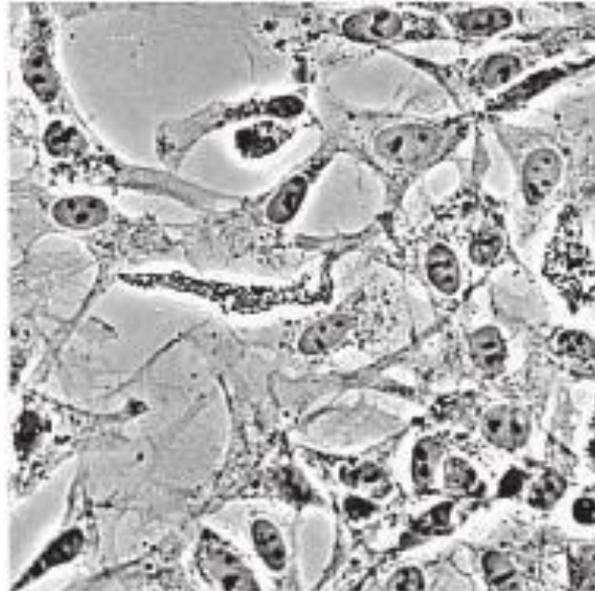


Contraste interferencial  
de Normarski: ácaro  
*Aponychus chiavegatoï*

# Cultura células crista neural



**Microscópio óptico de luz**



**Microscópio contraste fase**



**Microscópio contraste interferencial de Nomarski**



*Amoeba verrucosa*, contraste fase Nomarski, algas no interior, 200x

*Amoeba verrucosa*, contraste fase 200X

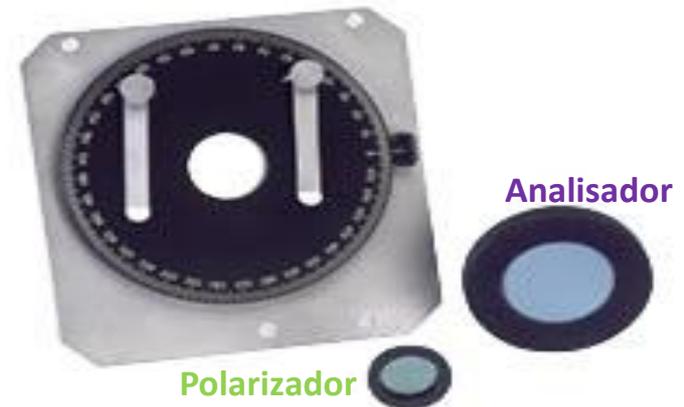
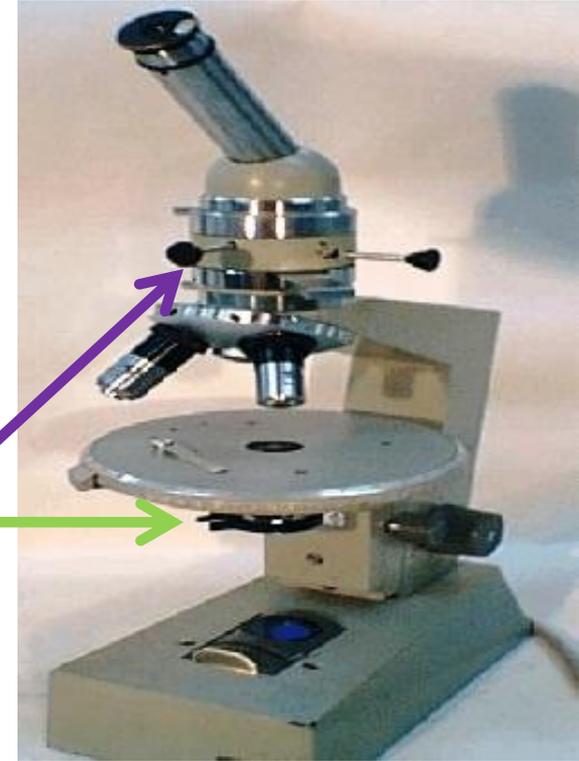


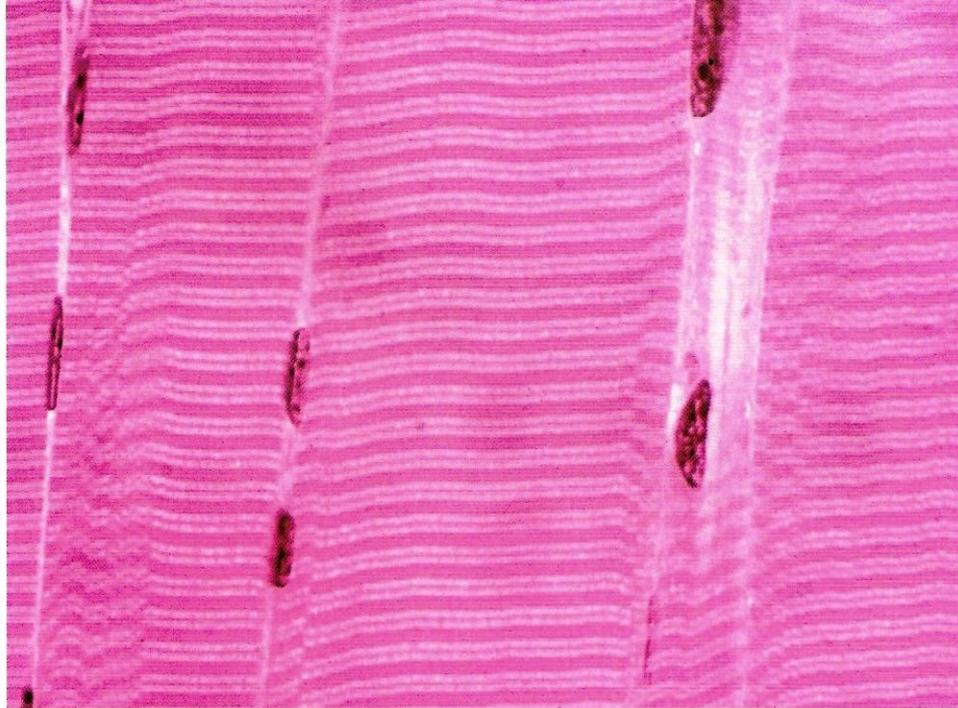
# Microscópio de polarização

Semelhante ao microscópio de luz, acrescido de dois prismas ou dois discos polaróides:

1. Polarizador: fica entre a fonte de luz e o condensador.
2. Analisador: fica entre a objetiva e a ocular

Os filtros conduzem o feixe luminoso em uma só direção, é o PPL, plano de luz polarizada.

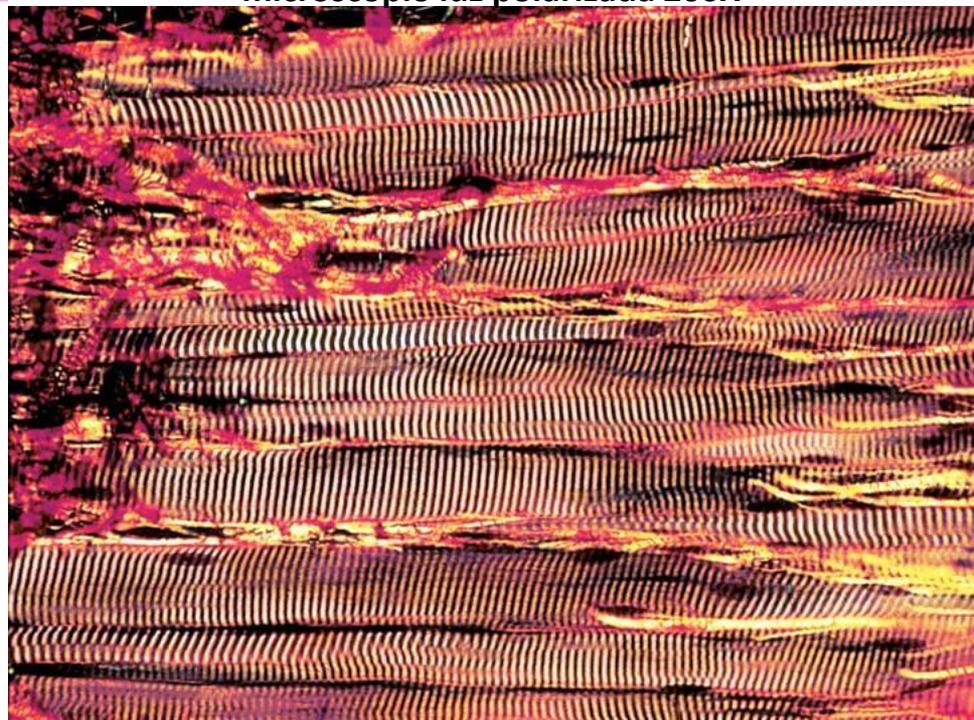




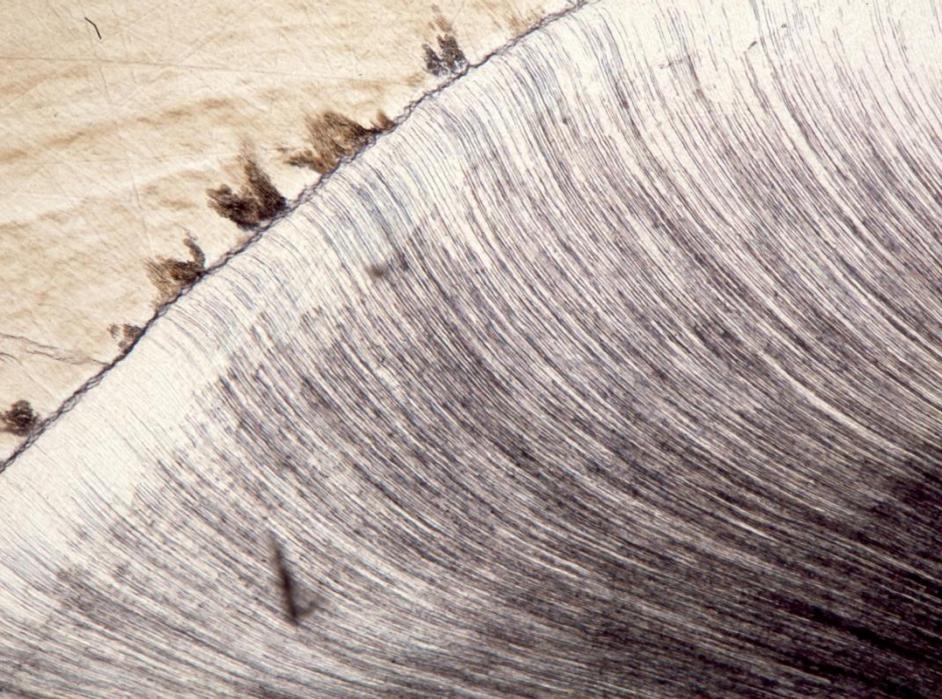
Músculo estriado esquelético, corte longitudinal, HE, microscópio óptico 400X

**Anisotrópico: são birrefringentes**  
**Isotrópico: não é refringente**

Músculo estriado esquelético, corte longitudinal, Picro-sirius, microscópio luz polarizada 200X

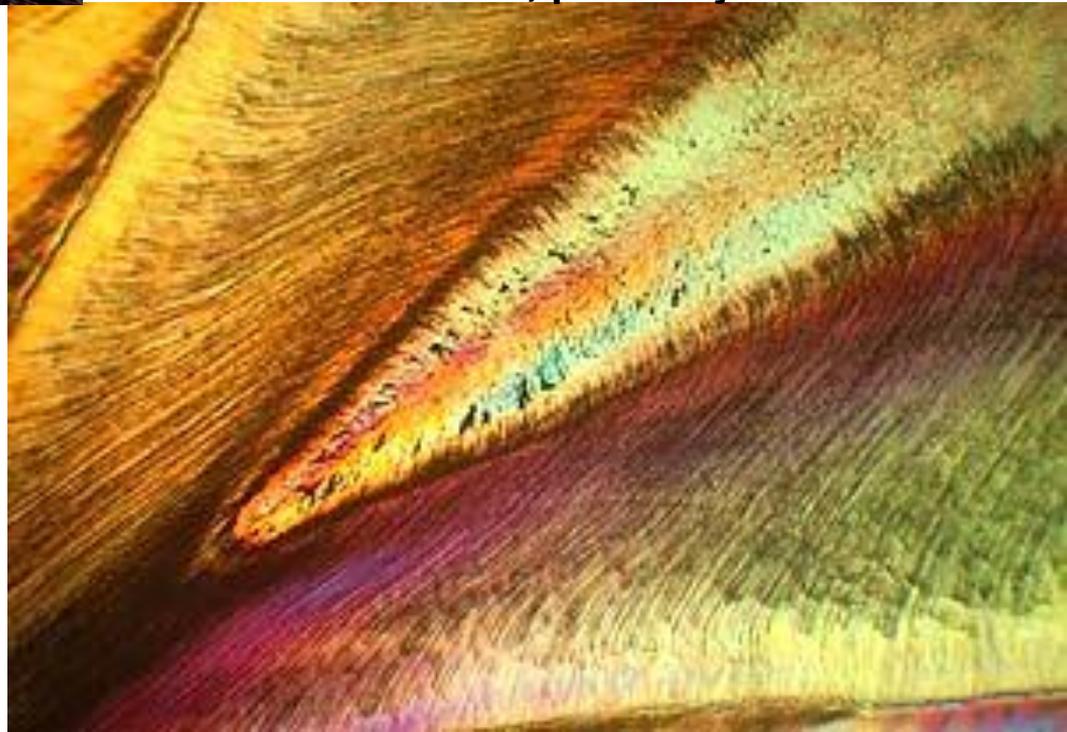


**Usado para o estudo do músculo estriado  
parede celular, espermatozóides, osso,  
esmalte dentário, dentina e DNA**



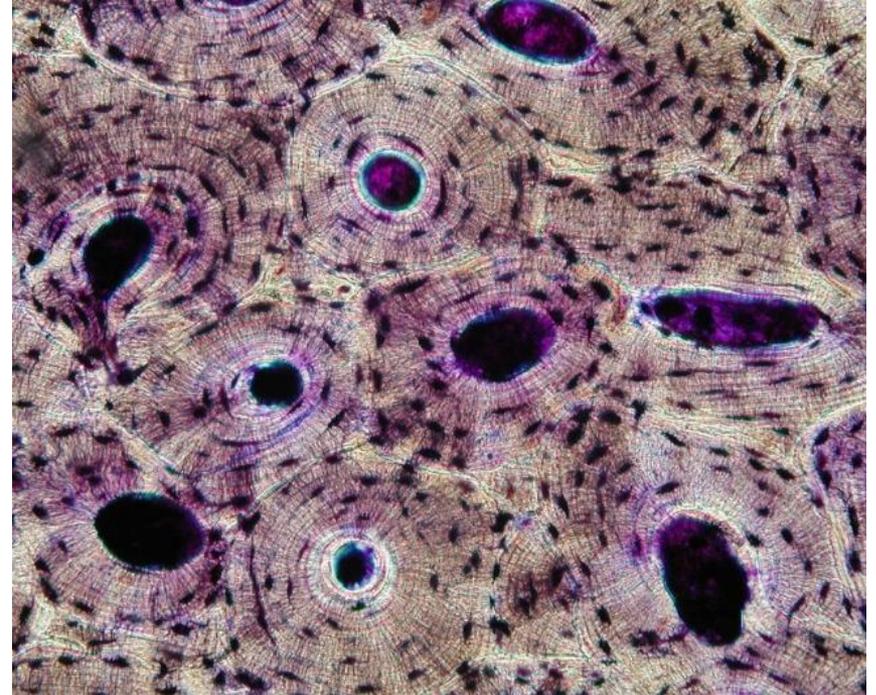
**Dente humano, MO 100x**

**Dente humano, polarização 100x**

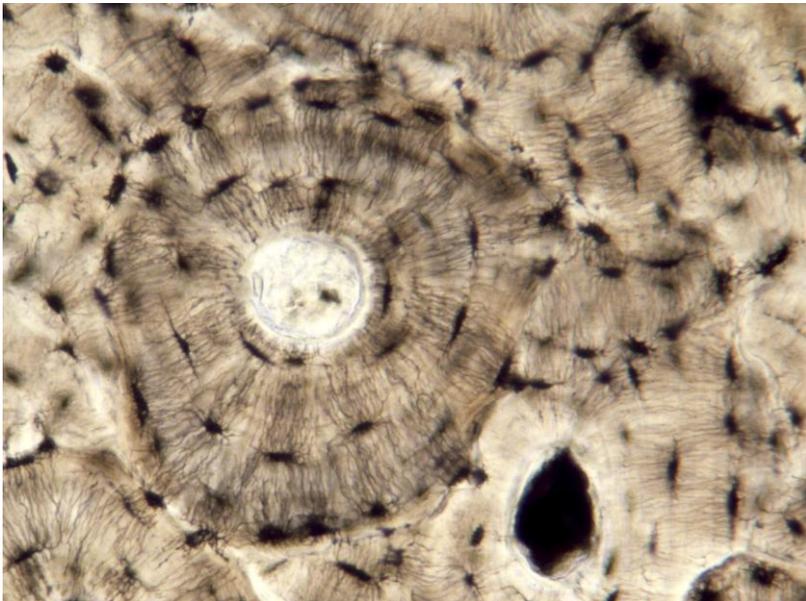




**Osso, MO, 40X**



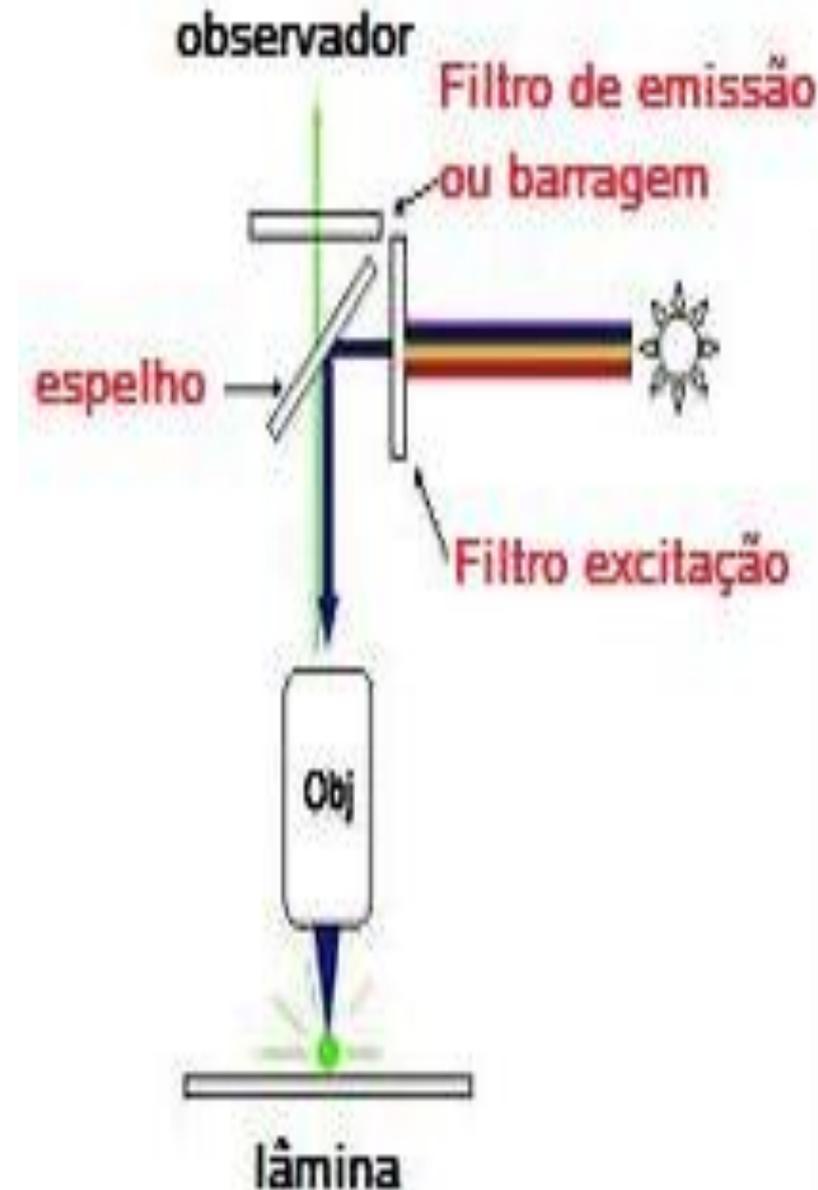
**Osso, Luz polarizada, 100X**



**Osso, MO, 400X**

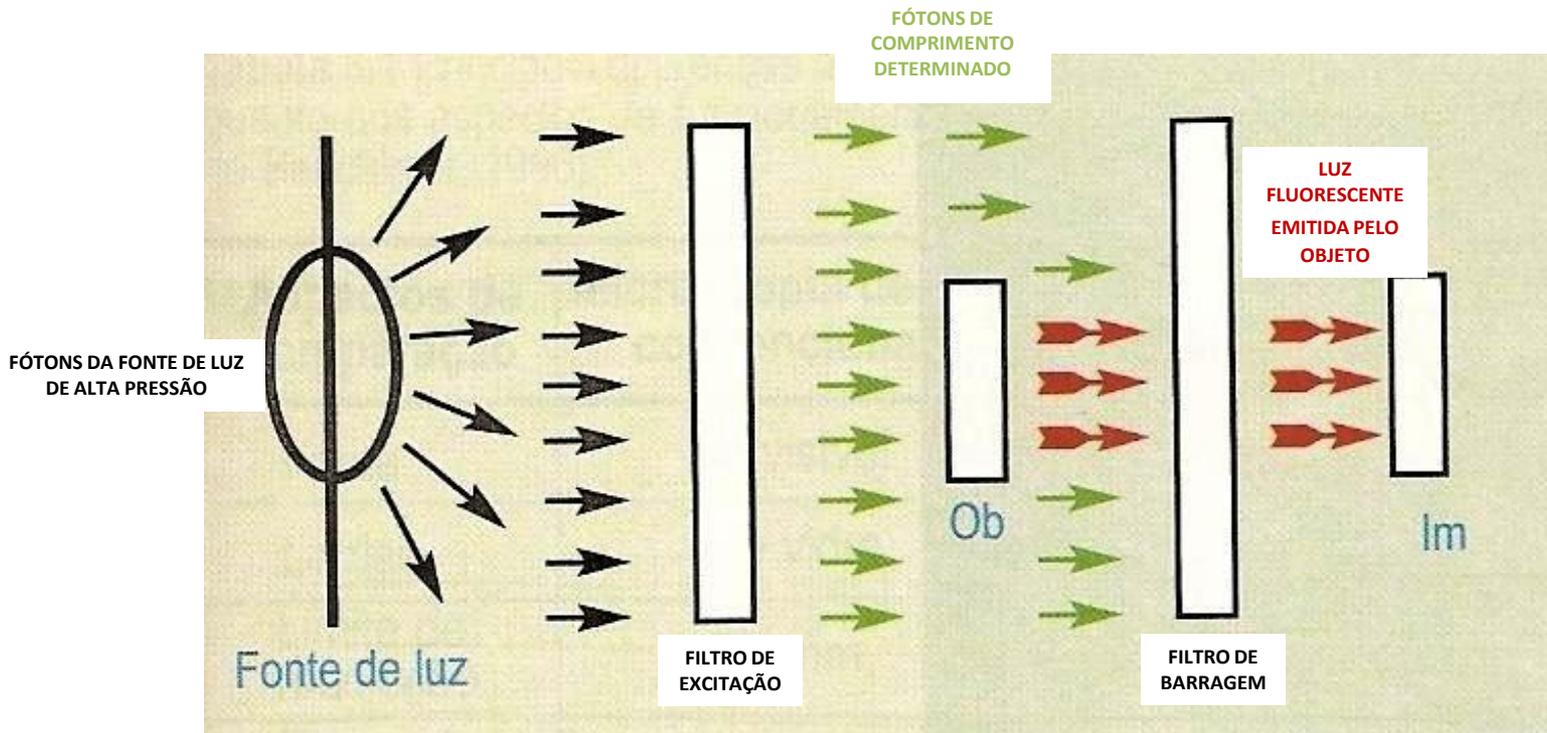
# Microscópio de fluorescência

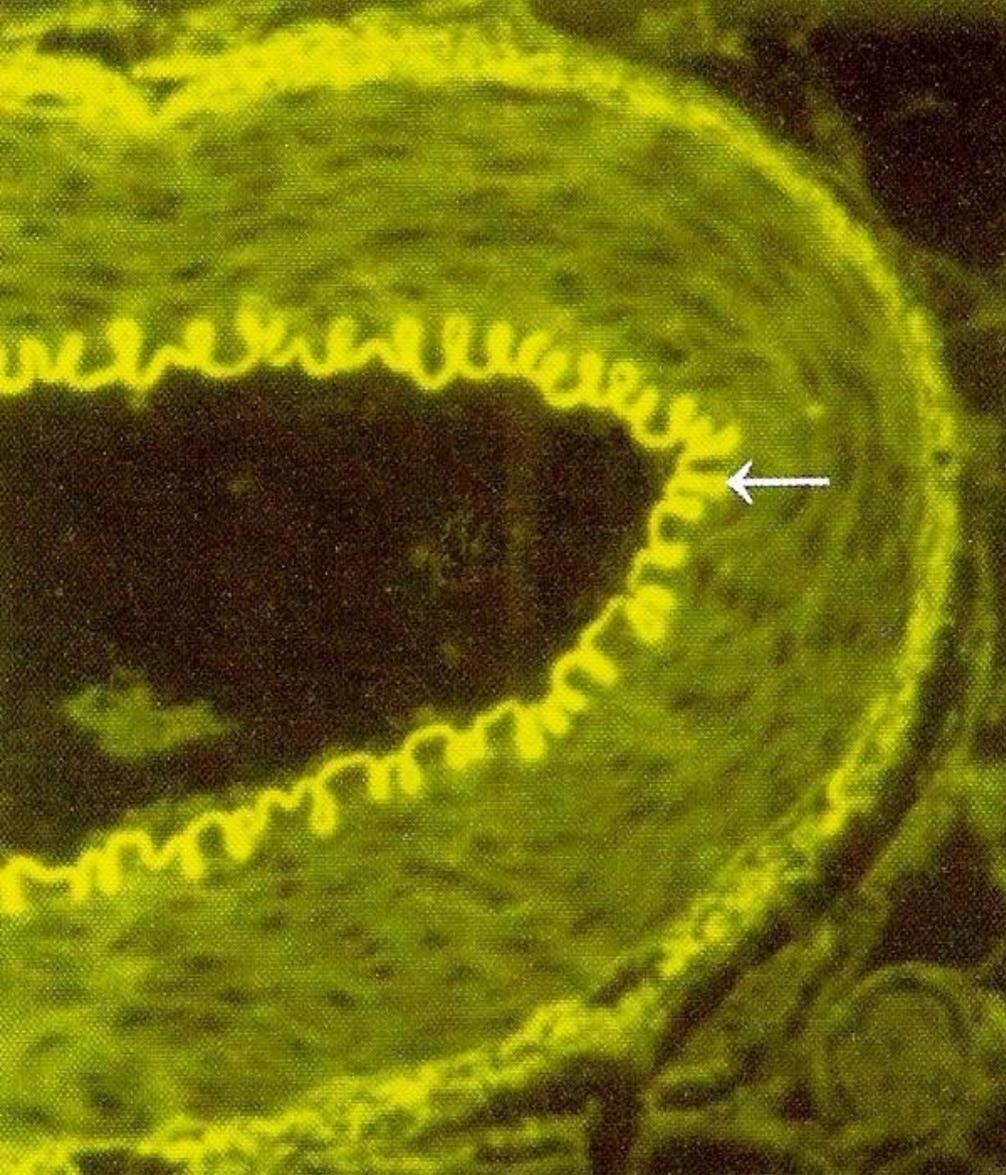
- Neste microscópio há um sistema óptico que interage pouco com a luz. A luz é de mercúrio de alta pressão, com picos de 312 a 579nm.
- Tem um sistema de filtros que detectam o brilho do material contra um fundo negro. São *filtros de excitação* e *filtros de barragem*.
- Filtros de excitação ficam logo após a saída da fonte de luz e antes do condensador, selecionam o comprimento de onda desejado.
- Filtros de barragem estão entre a objetiva e a ocular, após o objeto, permitem a passagem da luz fluorescente emitida pelo espécime analisado, barrando assim a luz de excitação. O material fluoresce contra um fundo escuro.
- Os filtros de barragem são selecionados pelo observador na hora do uso de acordo com o fluorocromo usado.



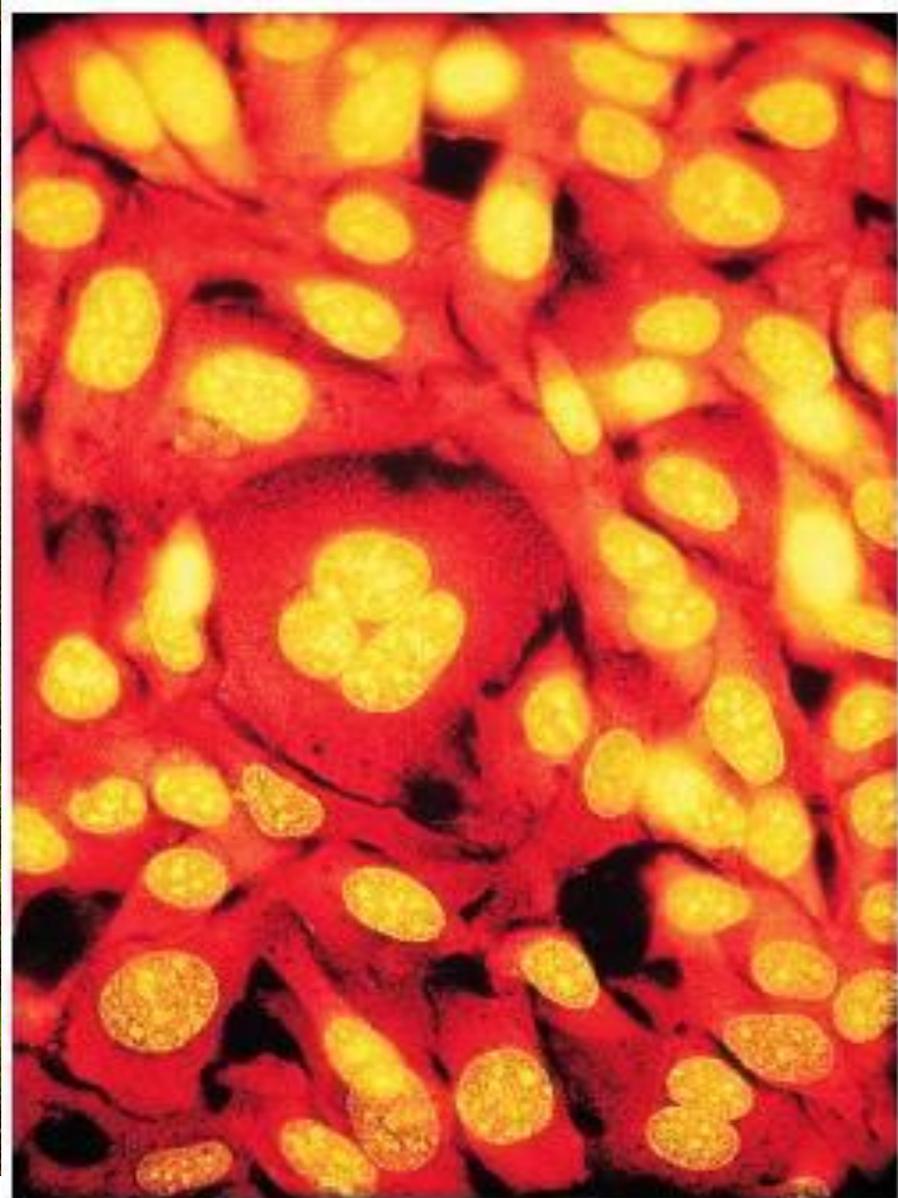
- Os fluorocromos se combinam com estruturas celulares, tornando-as fluorescentes, permitindo a sua identificação e localização.

Ex.: alaranjado de acridina se liga ao DNA e fica amarelo e ao RNA que fica vermelho





**Artéria muscular ,HE, evidência a fluorescência da limitante elástica interna e externa**



**Fig. 1.7** Fotomicrografia de células de rim de hamster em cultura, coradas com alaranjado de acridina. Por meio de um microscópio de fluorescência, o DNA (no interior dos núcleos) emite luz amarela, enquanto o citoplasma rico em RNA aparece de cor avermelhada ou laranja. Grande aumento. (Cortesia de A. Gerald e JMV Costa.)

# Microscópio confocal por varredura a *laser*

- Desde 1987, usado em materiais espessos, sem coloração, vivos ou pré-fixados.
- Os microscópios tradicionais trabalham com imagens analógicas, o confocal a *laser* usa **imagem digital**.
- A óptica é igual ao de microscópio de fluorescência, mas usa *laser* como fonte de luz
- A iluminação não ocorre em todo o campo, ocorre em pequenos pontos de iluminação pelo *laser*.

- Acima da objetiva há um orifício chamado *pinhole* ou *íris*, que bloqueia a luz proveniente de objetos que estejam fora do plano focal.

**SÓ UM PLANO DO CORTE É ANALISADO DE CADA VEZ**

- Estuda-se o detalhe das estruturas subcelulares que não tem limite de resolução compatível ao da MO fluorescente convencional. Ex.: microtúbulos, elementos fibrilares do citoesqueleto e elementos finos da matriz extracelular.

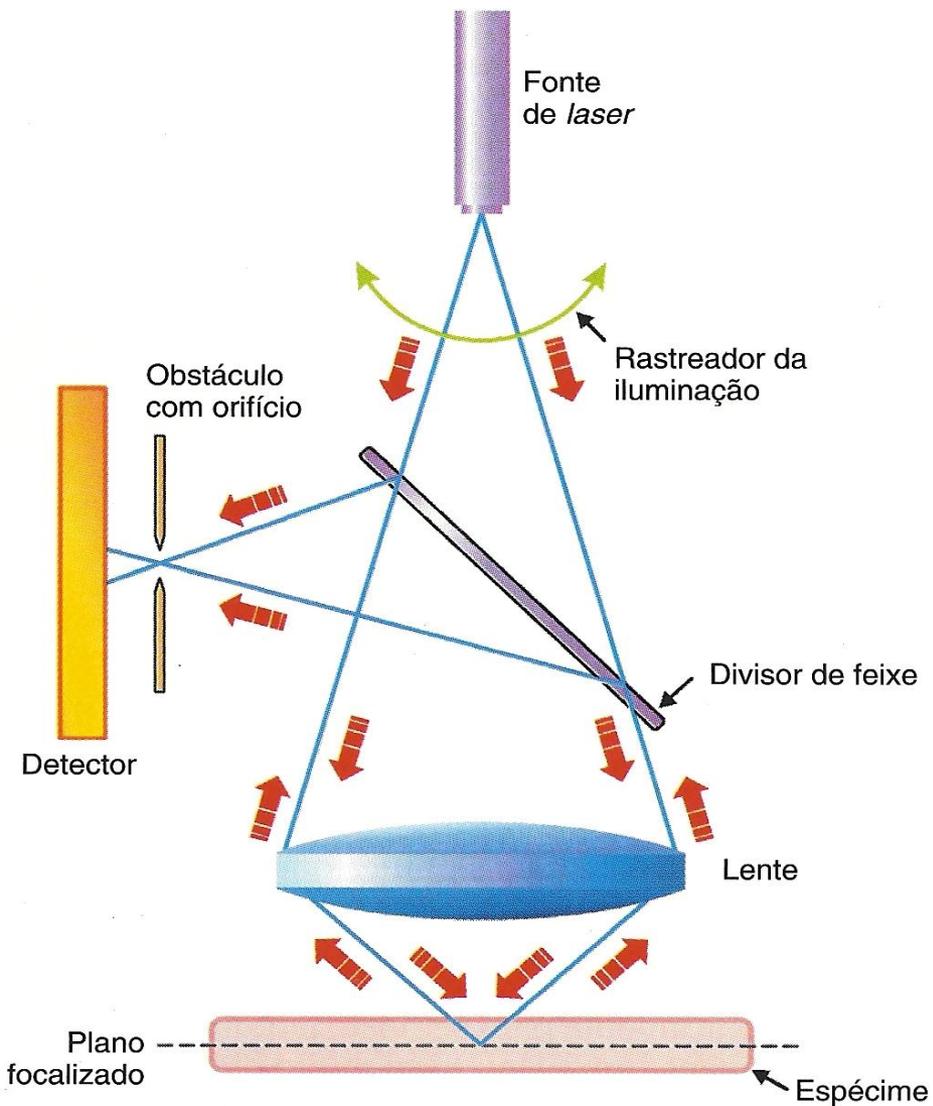
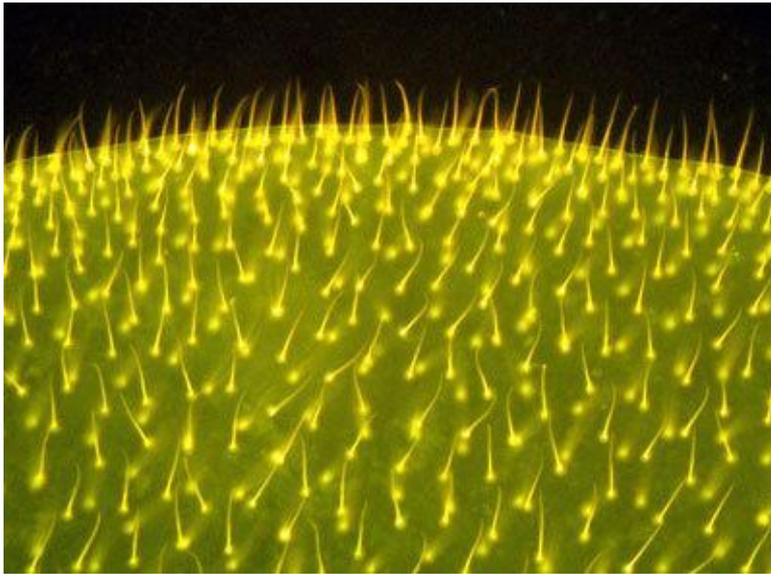
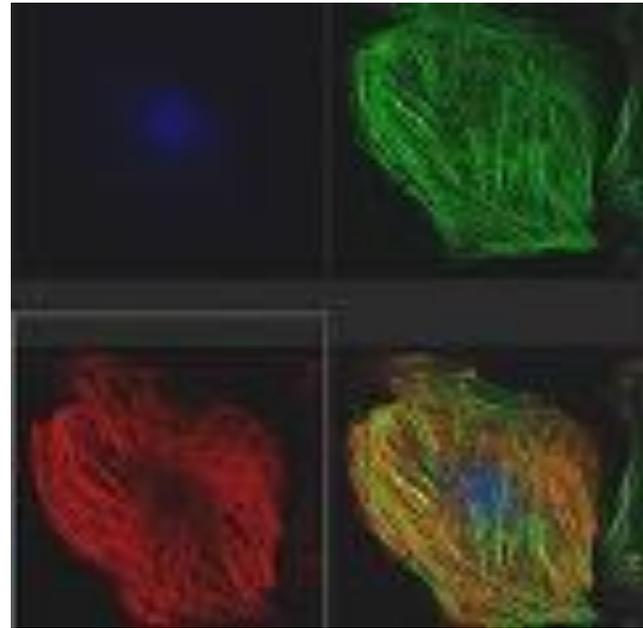


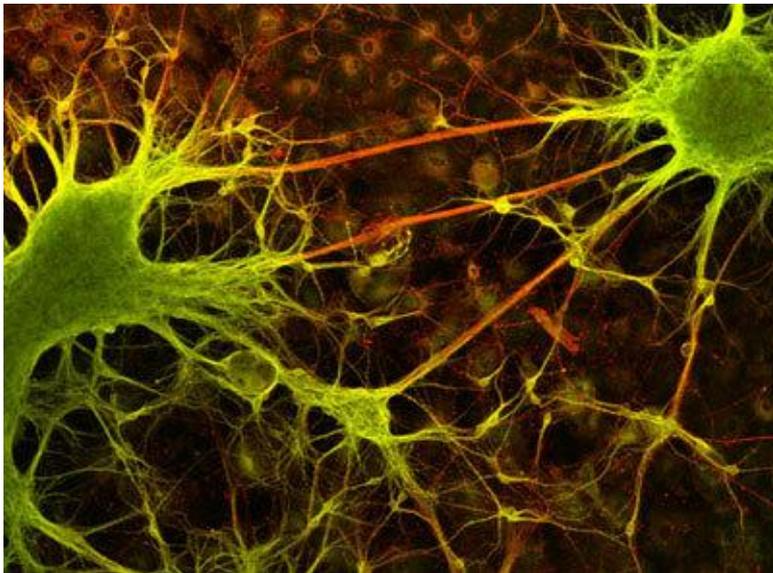
Fig. 1.6 Esquema do funcionamento de um microscópio confocal. A iluminação de uma fonte de *laser* atinge o espécime e é refletida. Um espelho dirige a luz refletida a um obstáculo que possui um pequeno orifício. A luz proveniente de planos do espécime que estão à frente ou atrás do plano focalizado é bloqueada pelo obstáculo. O *laser* varre o espécime para que uma área maior do corte possa ser observada.



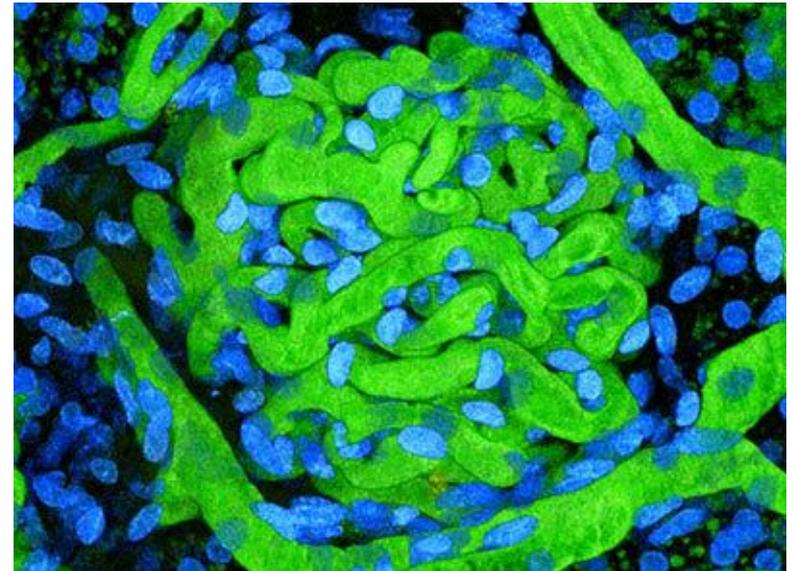
Cílios traquéia 40x



Elementos fibrilares do citoesqueleto



Neurônios 40X



Glomérulo 60X

# Microscópio eletrônico

- Em 1931, Max Knoll e Ernest Ruska construíram o primeiro microscópio eletrônico.
- Os princípios da óptica da ME são os mesmos do microscópio de luz, com algumas diferenças
  1. a fonte geradora dos feixes de elétrons fica na **porção superior** do aparelho
  2. a imagem **não é invertida**.

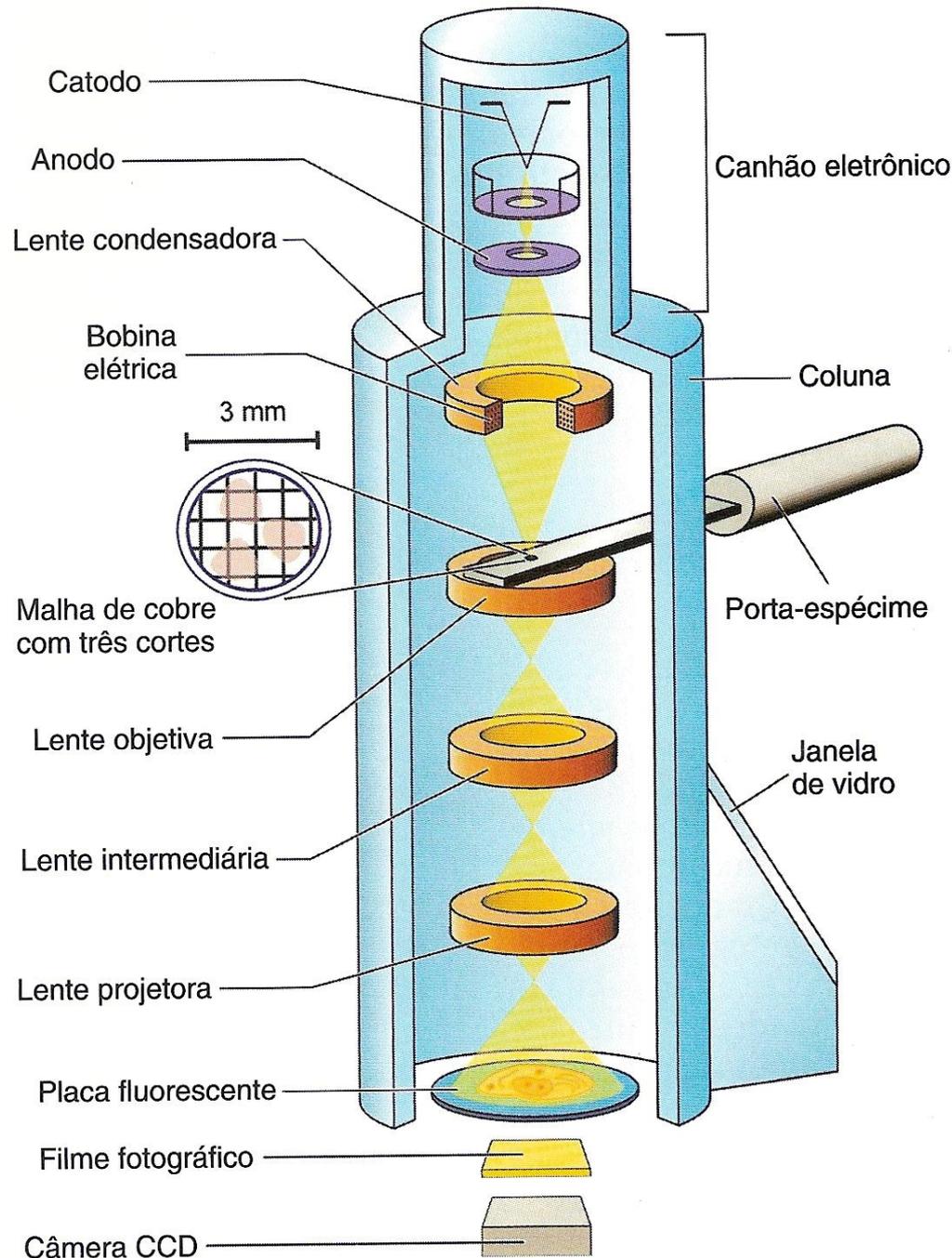
# MO x ME

Aspectos de comparação	Microscopia de luz convencional	Microscopia eletrônica de transmissão
Fonte	luz visível	elétrons
Lentes	de vidro	eletromagnéticas
Limite de resolução	200 nm	0,2 nm
Formação da imagem	absorção	elétron-opacidade

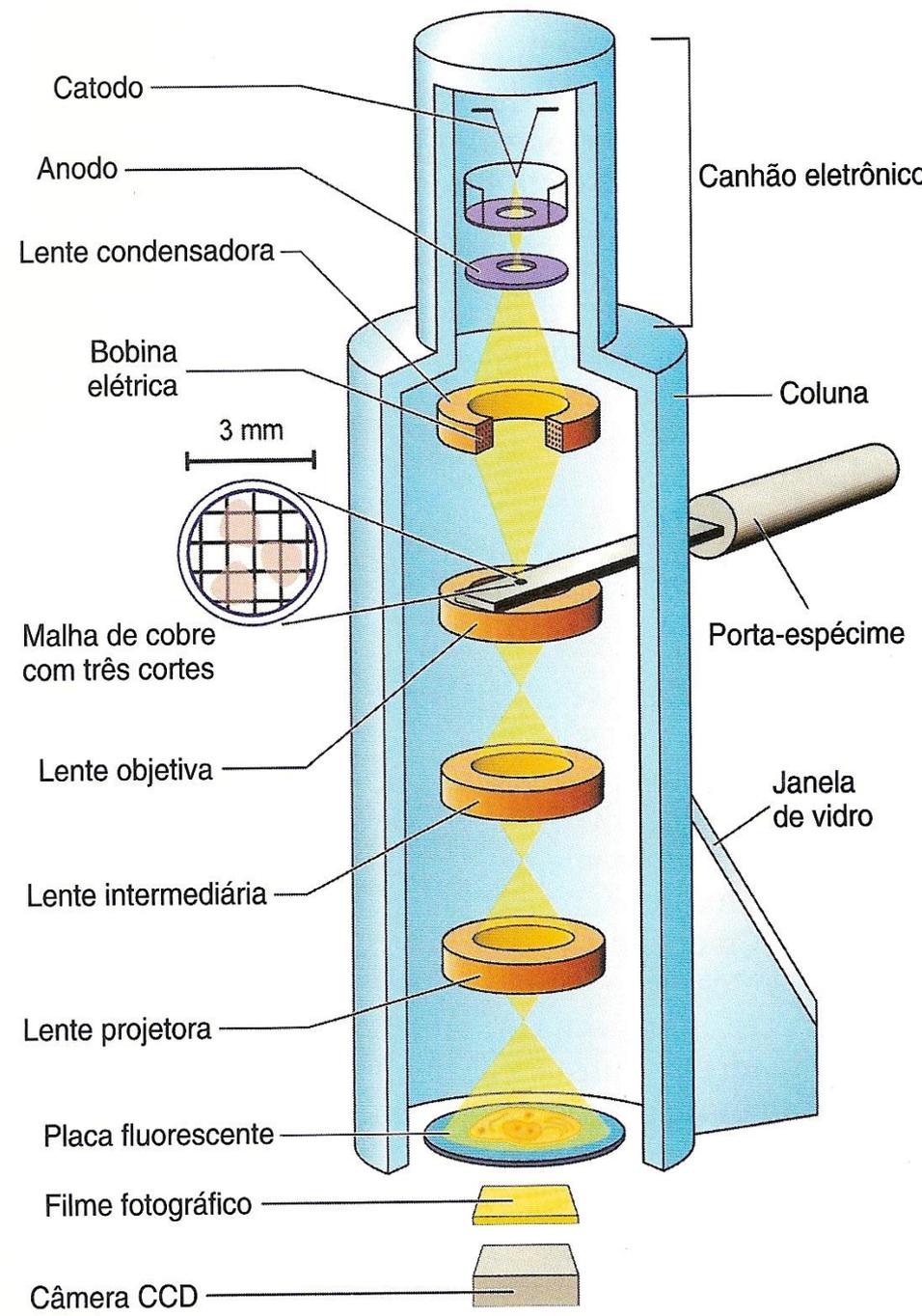
# ME transmissão

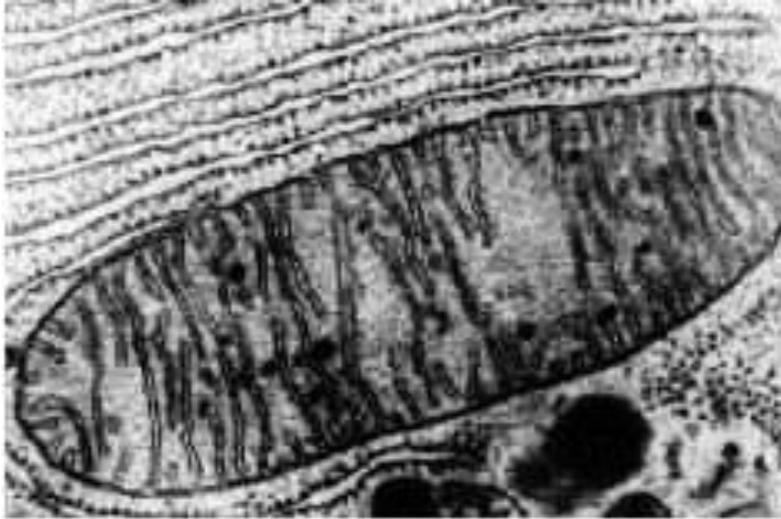


- Os elétrons têm que interagir com o objeto para gerar a imagem, o objeto tem que ser extremamente fino para permitir a passagem de elétrons.
- Os elétrons saem de uma fonte geradora, passam por lentes eletromagnéticas, disposta em uma coluna um sistema de alto vácuo. Os feixes de elétrons são acelerados e se desprendem do filamento por diferença de potencial.
- Os elétrons saem da fonte geradora, são encaminhados para a lente condensadora dos feixes, que os direciona para o objeto. **A lente intermediária e a lente projetora ampliam o padrão de transparência dos elétrons.**

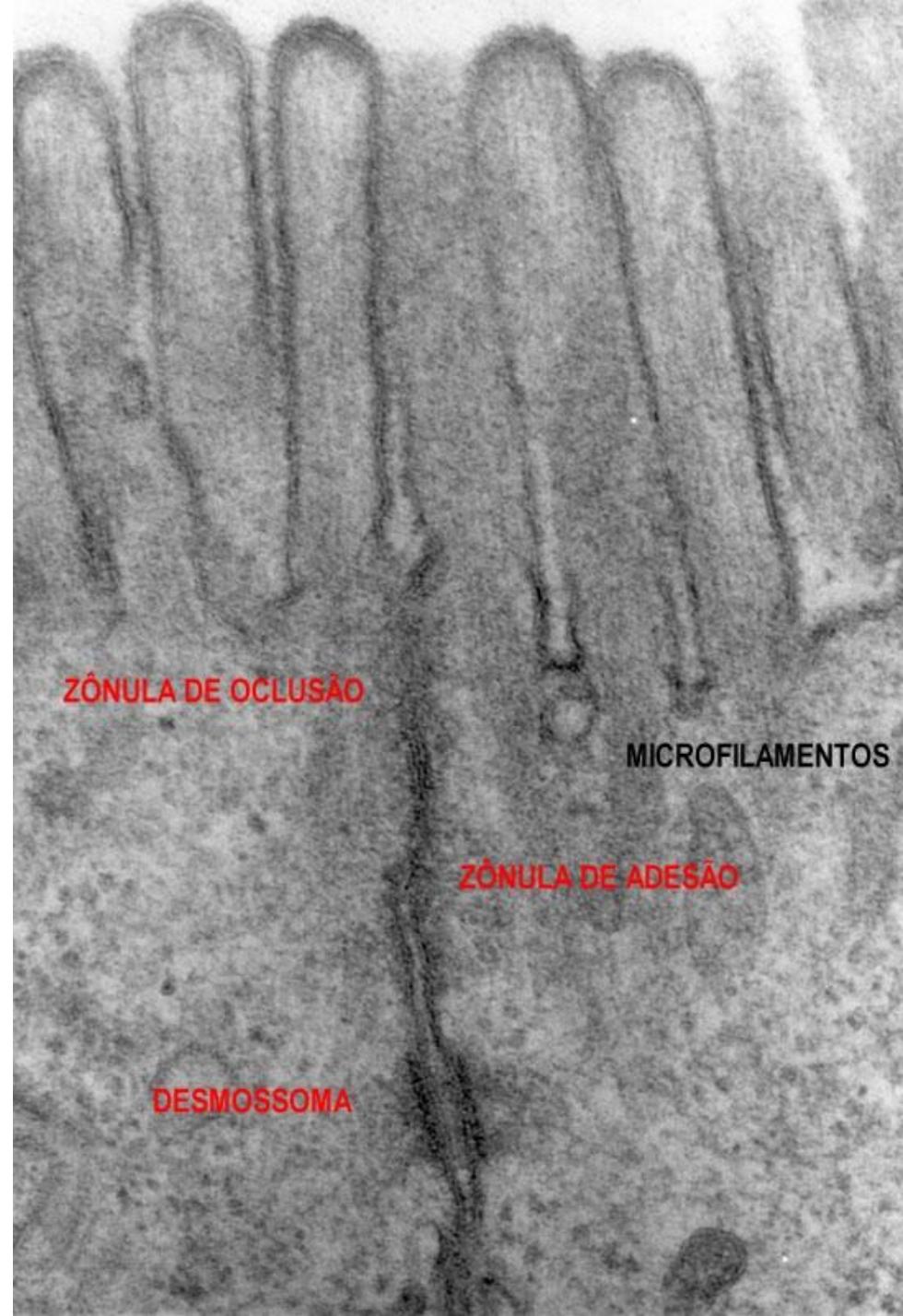
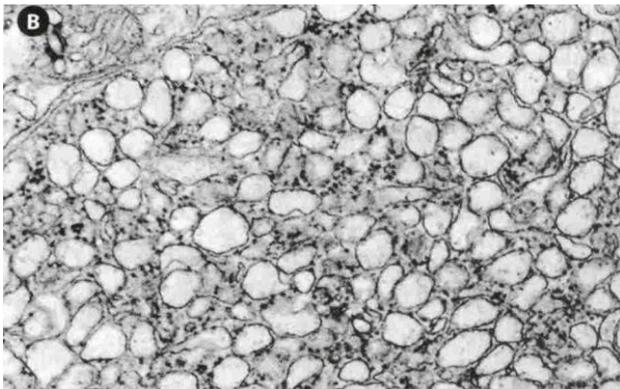


- Após a ampliação da imagem ela é projetada sobre um anteparo fluorescente, uma placa fluorescente, um negativo fotográfico ou câmera CCD (monitor).
- Quando os elétrons encontram elementos como ferro, ósmio, chumbo ou ouro, formam uma imagem eletrondensa ou escura.
- Quando encontra elementos como o hidrogênio, carbono, nitrogênio ou oxigênio a imagem é eletrolúcida ou clara.





ultra estrutura mitocôndrial observada  
no TEM, ampliação de 60.000X



ZÔNULA DE OCLUSÃO

MICROFILAMENTOS

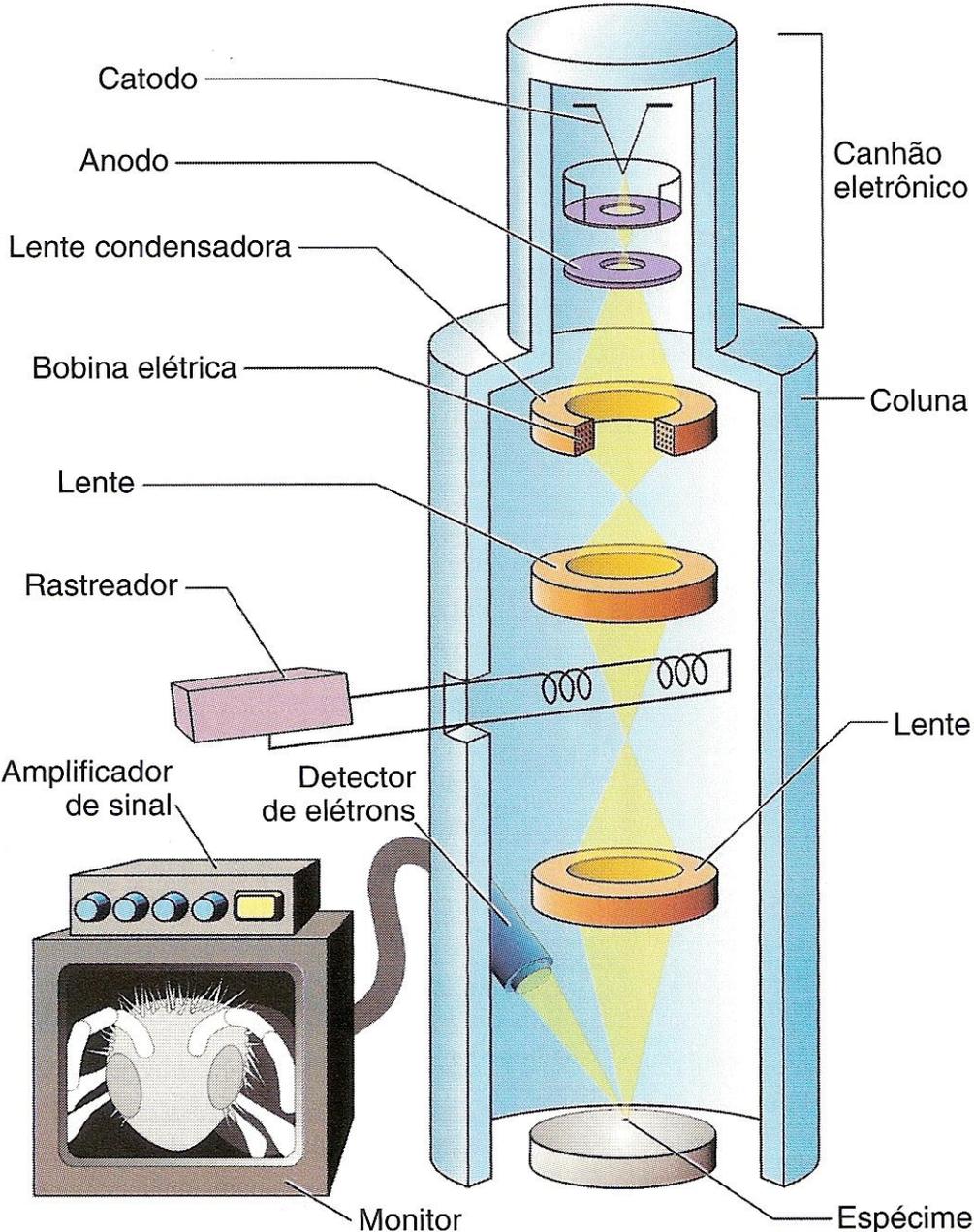
ZÔNULA DE ADESÃO

DESMOSSOMA

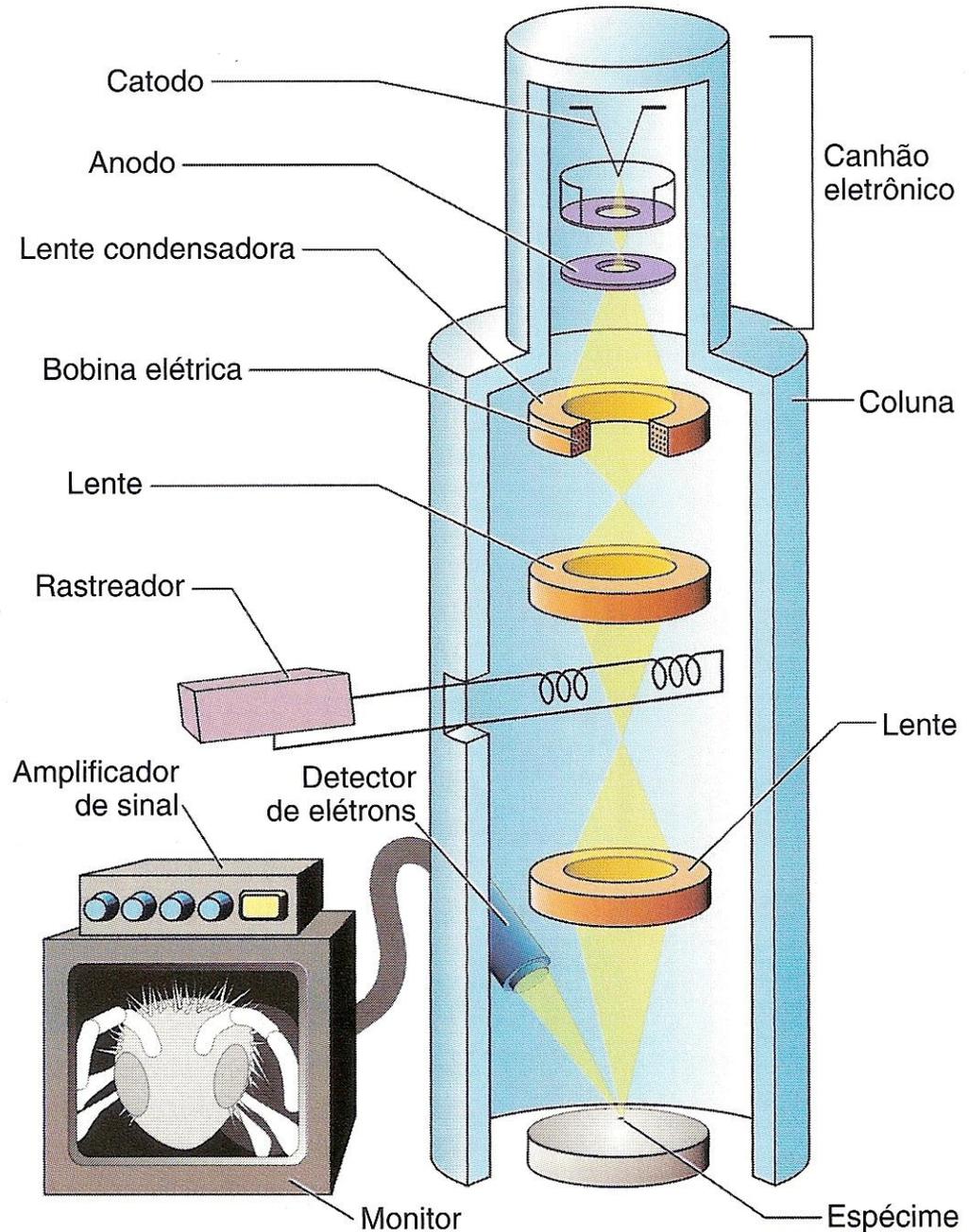
# ME Varredura

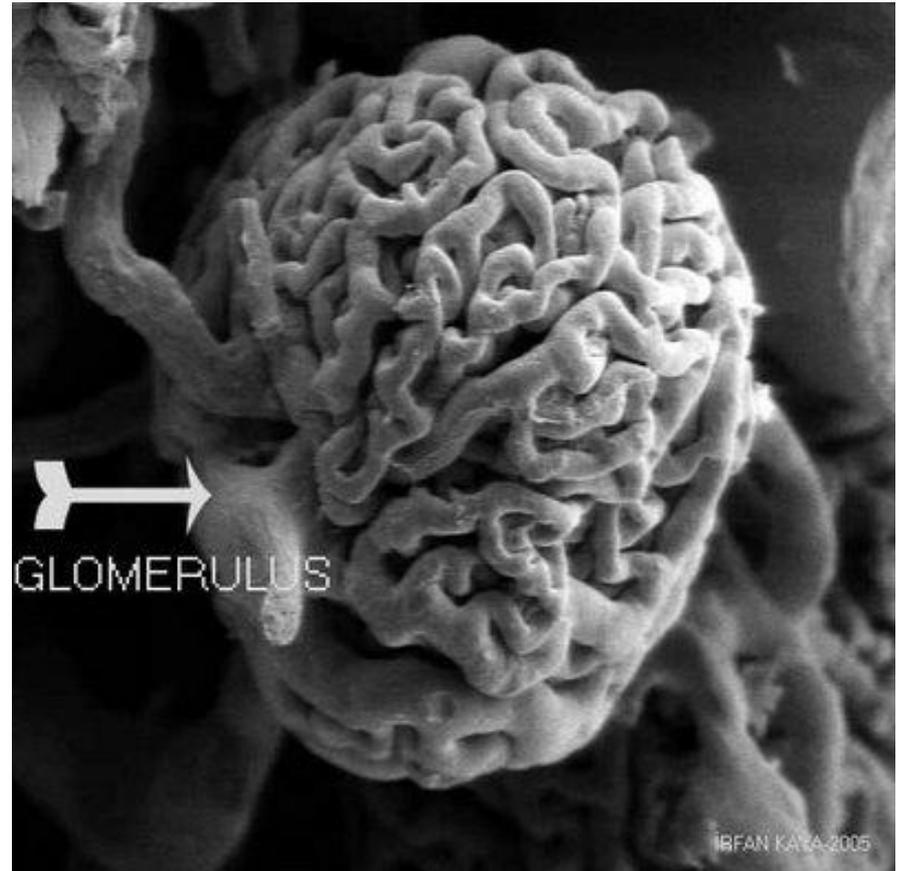
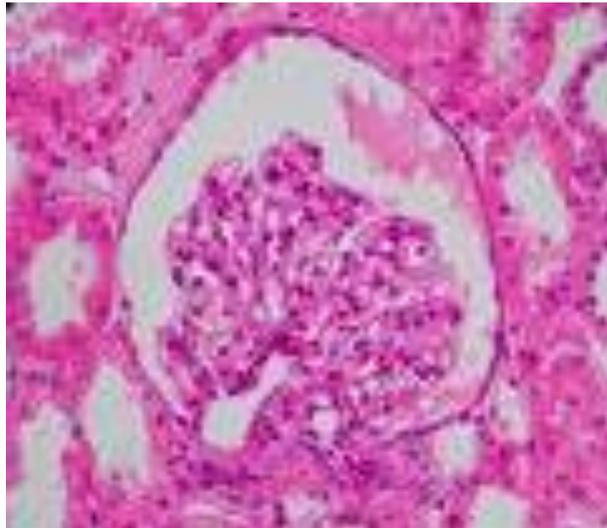
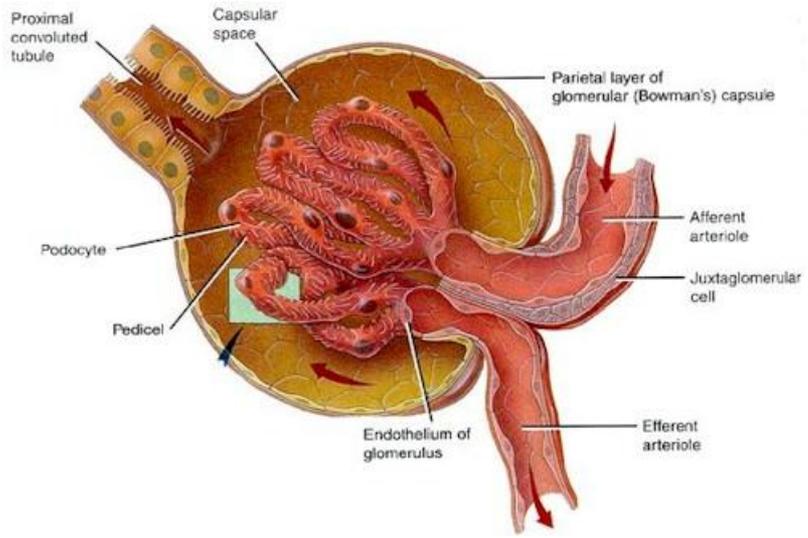


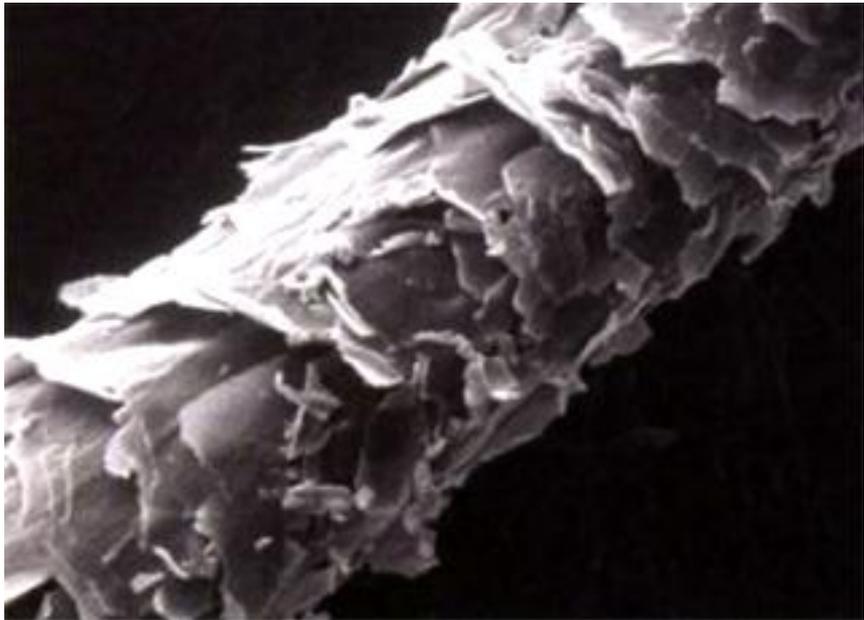
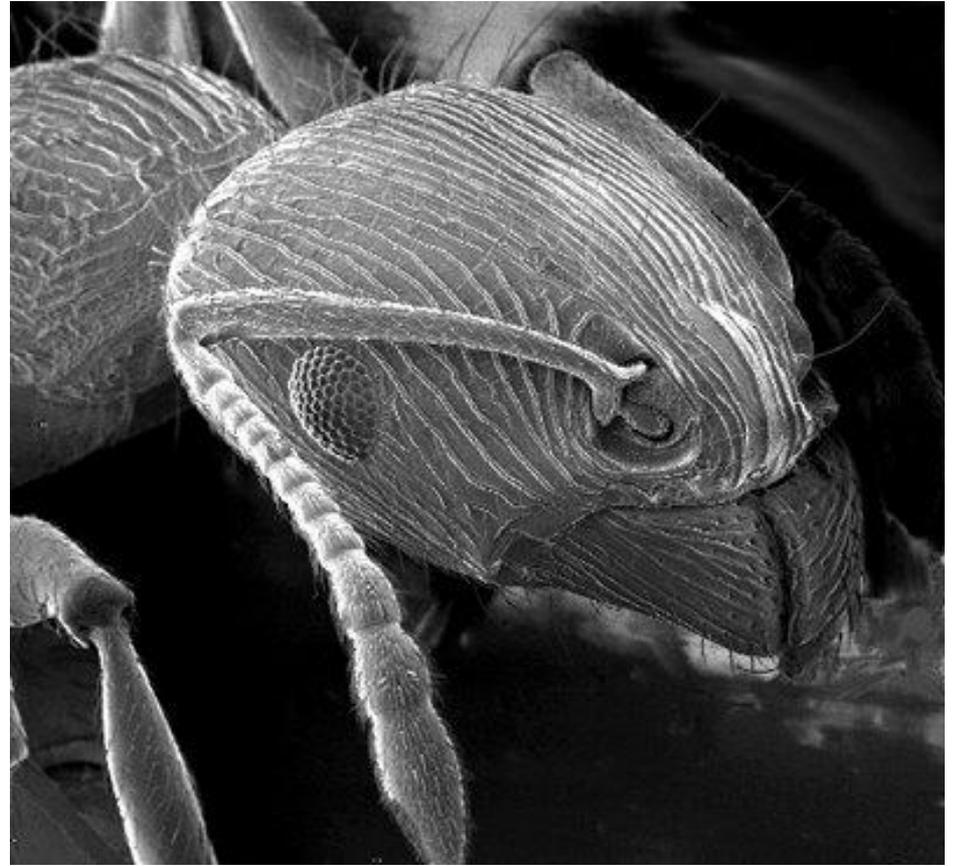
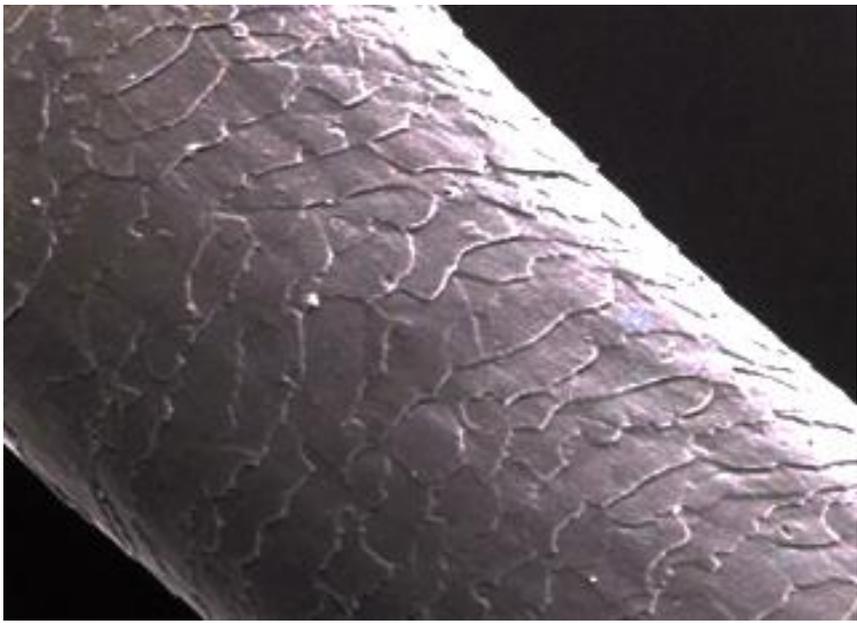
- Revela superfícies topográficas com grande nitidez de detalhes.
- As imagens são tridimensionais e são obtidos por elétrons secundários ou refletidos, eles partem da superfície da amostra quando ela é bombardeada pelo feixe eletrônico.

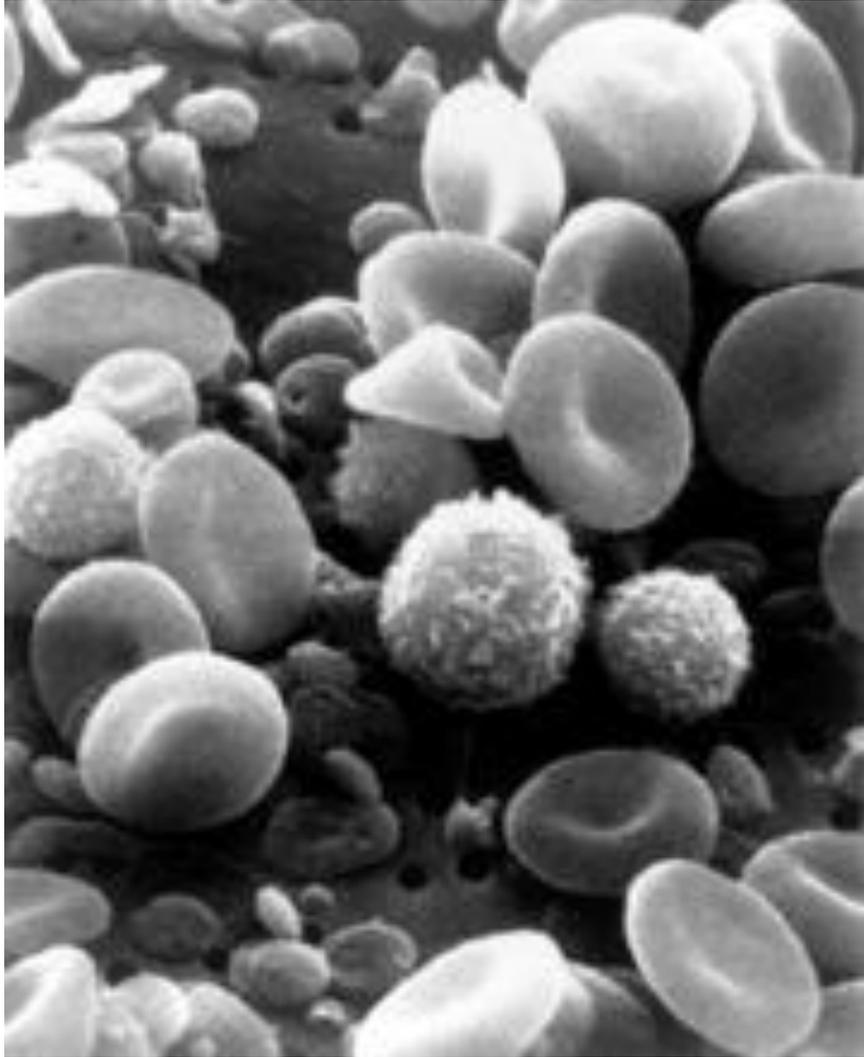


- É formado por um sistema de geração de elétrons que varre a superfície do espécime, quando ocorre a formação do sinal que dará origem imagem.
- Um sistema de captação de elétrons secundários coleta o sinal e o amplifica, finalmente um sistema para compor a imagem final, que é visualizada em um monitor de vídeo.

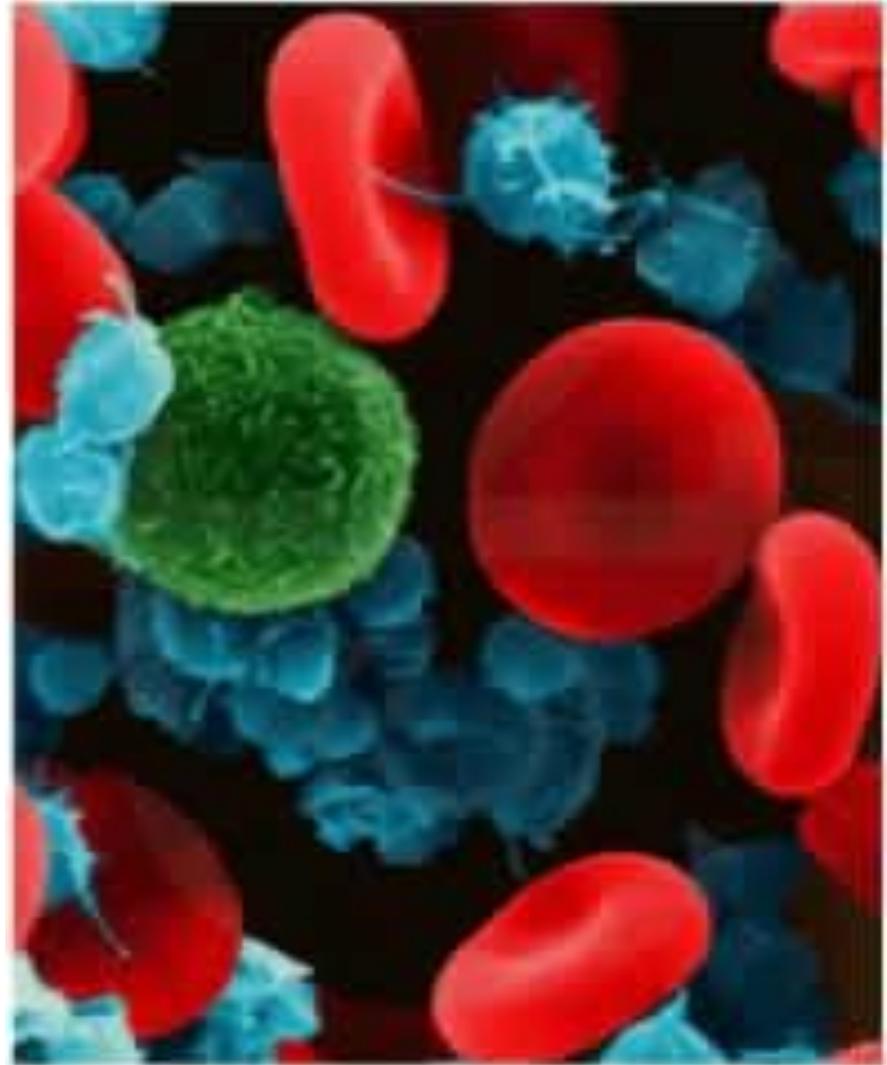








Hemácias e leucócitos em *scanning*



Hemácias e leucócitos em *scanning*,  
coloridos por software

**OBRIGADA!**