

## Microscopia

**1 – Introdução** – o desenvolvimento de um determinado campo do conhecimento científico depende do grau de informações que o homem possa conseguir a respeito. A curiosidade que houve sempre em relação à estrutura íntima da matéria viva ou inerte, só encontrava paralelo na ânsia de se descobrir algo em torno dos mundos que se vislumbravam no espaço. Como, no entanto, tudo dependia dos sentidos humanos, tais reflexões esbarravam ambas nos limites que o olho humano possuía: não só a visão do homem não enxergava muito longe, como não discernia bem a intimidade dos objetos terrestres.

Denomina-se “**limite de resolução**” a menor distância entre duas partículas das quais o instrumento óptico é capaz de produzir imagens separadas com os limites que vimos, o olho humano normal, visão igual a 1, tem um limite de resolução igual a 0,2 mm. Abaixo desse valor a visão humana não distingue estrutura alguma. Essa capacidade humana de enxergar estruturas muito pequenas fez com que se imaginasse existir na natureza todo um mundo de detalhes que desconhecíamos simplesmente porque não tínhamos visão suficiente para distingui-los. As tentativas para superar tais deficiências criaram um enorme cabedal tecnológico constituído pelo que se chamou microscopia (do grego *mícron* = pequeno e *scapein* = examinar) e que começou pela microscopia óptica.

O desenvolvimento da citologia, e por conseqüência da própria biologia, está diretamente relacionada com a invenção e aperfeiçoamento do microscópio. Sabe-se que as lupas e lentes de aumento datam de séculos anteriores à era cristã. A microscopia óptica baseia-se no uso de lentes de vidro ou cristal. O estudo teórico das lentes bem como algumas propriedades ópticas das superfícies curvas vem de tempos muito remotos, tendo sido conhecidas por Euclides (323 a.C.). Cita-se como fato de destaque, que o imperador de Roma, Nero, por ser míope, acompanhava com uma lente o combate dos gladiadores.

Embora Ptolomeu (151 d.C.) e Alhazen (1.039 d.C.) continuasse a usar as lentes de aumento posteriormente, nada de prático se havia feito em torno do assunto. Naquela época, o conhecimento que se tinha sobre a vida dos organismos era incompleto, antes da descoberta do microscópio. Plantas e animais foram até então estudados a olho desarmado. Decorreram muitos séculos antes que Salvino delgli Armati construísse os primeiros óculos (lentes), em

1.285, na Itália. No século XVI, Leonardo da Vinci e Francisco Maurolyco insistiram na vantagem de aplicação das lentes para aumentar a visão de objetos pequenos.

Como parte de aparelhos ópticos utilizados nas ciências, as lentes começaram a tomar forma de microscópio simples e composto. Em 1.590 os irmãos holandeses, Hans Janssen e Francisco Janssen, ainda meninos, filho de um comerciante e técnico de óculos, ou seja, fabricante de lentes (Zacharias Janssen) aproveitando a experiência que seu pai tinha sobre o assunto, colocando por simples curiosidade duas lentes convexas, uma um pouco distante da outra, verificaram um surpreendente efeito: observaram que determinados objetos eram aumentados muitas vezes, o que não acontecia com os mesmos objetos vistos através de uma só lente.

Esta experiência levou os irmãos Janssen a construírem o primeiro microscópio composto, que consistia em um tubo, dentro do qual colocaram uma lente em oposição à outra. Dessa maneira, eles fizeram o primeiro sistema composto de lentes, funcionando como amplificador na observação de estruturas pequenas e desse modo inventaram o microscópio composto. Tal descoberta despertou a atenção de muitos pesquisadores que procuraram aperfeiçoar o novo instrumento, dando-lhe maiores dimensões.

Tal instrumento recebeu o nome de “**microscópio**” dado por Juan Faber de Bamberg, médico italiano a serviço do Papa Urbano VII. Um dos primeiros a empregar o microscópio foi Pedro Borel, médico de Luís XIV. Com o tempo a microscopia óptica ampliou-se e demonstrou que de fato havia todo um mundo de estruturas que desconhecíamos e foi revelado por esse tipo de microscopia.

Coube, entretanto, ao simples amador, autodidata e naturalista holandês Anton van Leeuwenhoek (1.632–1.723), a glória de ter sido o primeiro a observar as células vivas e de ter passado à história como sendo o verdadeiro inventor do microscópio, depois de haver construído cerca de 247 diferentes sistemas de lentes para esse instrumento. Assim, em 1.974 Leeuwenhoek produziu lentes suficientemente poderosas para observar bactérias de 2 a 3 micrômetros de diâmetro e dessa forma, descobriu um mundo de minúsculas criaturas. Deve-se a ele o estudo dos infusórios, de bactérias, do espermatozóide, dos glóbulos vermelhos do sangue e de inúmeras outras descobertas no campo dos infinitamente pequenos.

De tudo o que se viu, deu conta quando escreveu o seu “**Segredos da Natureza**”, trabalho que foi por ele apresentado à “**English Royal Society**” e recebido com o mais frio ceticismo

pelos membros mais ilustres daquela instituição. O interessante é que Robert Hooke, então presidente da referida associação, estimulado por Leeuwenhoek, construiu o seu próprio microscópio (mais aperfeiçoado) e com ele observou, pela primeira vez, células mortas, constituintes de uma delgada lâmina de cortiça e examinando-os com o auxílio de seu instrumento ainda rudimentar. Hooke, utilizando um microscópio ainda bastante rudimentar, iluminado a vela, observou que a cortiça (“**casca**” **das árvores**) era formada por numerosos compartimentos vazios, pequenas cavidades revestidas por paredes, as quais denominou de **cellula**, diminutivo do termo latino **cella**, que significa lugar fechado, pequeno cômodo ou cavidade (**littles boxes or cells**), que posteriormente foi aperfeiçoado para célula.

Hooke descreveu as suas observações no seu trabalho “**Micrografia**” e o apresentou à “**Royal Society**”. Estudos semelhantes foram também realizados pelo sábio italiano Marcelo Malpighi, pelo inglês Nehemiah Grew, pelo holandês Jan Swammerdam, pelo russo Mikhail Lomonosov e muitos outros.

Mas o aperfeiçoamento do assunto levou ao conhecimento de que a própria microscopia óptica tinha seus limites. Os trabalhos de Ernesto Abbé, físico alemão (1.840–1.905), sócio da firma C. Zeiss mostraram que o poder de resolução dos microscópios estava na dependência do comprimento de onda da luz que neles se empregava.

**2 – Definição** – é a observação de objetos ou seres minúsculos, por intermédio do microscópio, instrumento que permite grande ampliação. É o conjunto de técnicas de observação de objetos de pequeníssimas dimensões, ou seja, é a arte de examinar os objetos com o auxílio do microscópio. A palavra deriva dos termos gregos *mikrós* (pequeno) e *skopeoo* (inspecionar ou examinar). Um microscópio óptico, equipado com lentes, pode ampliar um objeto até 1.500 vezes; já um eletrônico, que usa magnetos ao invés de lentes, é capaz de uma ampliação (conseguida por meio de feixes de elétrons) superior a 100 mil vezes. Ele apresenta grande semelhança funcional com o microscópio óptico, embora use um sistema emissor de elétrons e não uma lâmpada comum. A coluna ou tubo do microscópio é formada, da região superior à inferior, por uma fonte de elétrons, duas “**lentes**” condensadoras, uma “**lente**” objetiva, uma “**lente**” de difração, uma mediana e uma de projeção. Desse modo, existe seis “**lentes**” no total, todas eletromagnéticas.

**3 – Tipos de Microscopia:**

**3.1 – Microscopia de Campo Claro** – a microscopia usual que os alunos praticam é chamada microscopia de campo claro. É possível acrescentarem-se diferentes acessórios ao microscópio óptico (M.O.) que permitem outros tipos de microscopia, tais como a de campo escuro, de contraste de fase, de interferência, de fluorescência, de polarização, entre outros.

**3.2 – Microscopia de Campo Escuro** – para obter este efeito é necessário impedir a entrada de raios luminosos centrais na objetiva. Usa-se iluminação oblíqua, ou interposição de um condensador especial, parabolóide, em vez do de Abbe, ou, mais simplesmente, interposição de diafragmas de campo escuro, colocados no suporte porta-filtro abaixo do condensador de Abbe. Assim, suprimem-se os raios centrais, e os raios periféricos só penetram na objetiva quando refletidos e desviados por partículas existentes na preparação. Estas aparecem como pontos brilhantes em fundo escuro. Com essa técnica é possível ver detalhes estruturais de células não coradas, visualizar bactérias e corpúsculos não visíveis em campo claro. O efeito é comparável à conhecida visualização de partículas de poeira num feixe de luz que penetra em quarto escuro.

**3.3 – Microscopia de Contraste de Fase** – a maioria dos componentes celulares é muito transparente e absorve pouca luz. Por isso, eles são pouco visíveis ao M.O. *in vivo* e em células mortas, fixadas. Comumente recorre-se a técnicas de coloração para evidenciá-los em cores contrastantes. Na microscopia de contraste de fase, tais componentes tornam-se perfeitamente visíveis na célula viva, sem se recorrer a qualquer artifício de técnica. a razão é que essas estruturas tem pequenas diferenças de densidade e de índice de refração que são evidenciadas na microscopia em contraste de fase. Esclarecendo melhor, convém lembrar que os raios luminosos que chegam ao objeto estão na mesma fase, ou seja, as cristas e vales de suas ondas coincidem perfeitamente. Ao atravessarem o objeto encontram estruturas com aquelas pequenas diferenças de densidade e índice de refração, e, conforme a densidade de tais componentes, sofrem atrasos maiores ou menores na travessia.

Evidentemente, os raios que atravessam apenas a membrana plasmática e a matriz citoplasmática são menos retardados que os que incidem nas mitocôndrias também. Estes, por sua vez, sofrem um atraso menor do que os que atravessaram tudo isso e mais o núcleo. Em conseqüência, ao saírem do objeto, tais raios estão em fases diferentes, ou seja, fora de fase ou defasados. Isto é, as cristas e depressões de suas ondas não coincidem mais. Diferenças de fase não são visíveis ao olho humano. A visão humana percebe apenas diferenças de amplitude ou intensidade perceptíveis à visão. Desse modo, são vistos na célula viva detalhes

morfológicos, contrastados em preto e branco, com a mesma nitidez que os observáveis em células mortas e coradas artificialmente.

A microscopia de contraste de fase além de permitir o estudo da célula viva teve o mérito de mostrar nesta, a mesma complexidade estrutural revelada pelos métodos clássicos de fixação e coloração. Revelou assim, que a estrutura do núcleo e do citoplasma não eram resultantes de artefatos, ou seja, produtos artificiais de técnica usada. Em suma, a microscopia em contraste de fase validou os resultados obtidos pela Citologia e Histologia clássicas.

**3.4 – Microscopia de Interferência** – baseia-se nos mesmos princípios da microscopia de contraste de fase, porém aplicados com técnicas mais refinadas. Permite discriminar pequenas diferenças de índice de refração nas estruturas celulares e assim determinar-lhes o peso seco que está relacionado com o índice de refração. Dá, portanto, importantes resultados quantitativos (microinterferometria). Além disso, são conversíveis em variações de cor. Conseqüentemente, os componentes celulares e de tecidos vivos aparecem diversamente coloridos, contrastando de maneira análoga a preparações coradas de técnicas clássicas.

**3.5 – Microscopia de Fluorescência** – substâncias fluorescentes são aquelas capazes de absorver radiações invisíveis, de curto comprimento de onda, como os raios X, elétrons, raios ultravioletas, emitindo em troca, radiações de maior comprimento de onda ou luz visível. As radiações usadas nesta variedade de microscopia são os raios ultravioletas. As substâncias fluorescentes localizadas nas células ou tecidos emitem luz visível e são assim reconhecidas ao M.O. É necessário o cuidado de usar filtros que protejam os olhos do observador contra a ação dos raios ultravioleta. Dois tipos de fluorescência podem assim ser estudados:

**3.6 – Fluorescência Natural ou Autofluorescência** – é aquela que ocorre normalmente em certos componentes das células ou tecidos vivos, como acontece com a vitamina A que tem fluorescência fugaz, verde ou amarela; as porfirinas que têm fluorescência vermelha; os depósitos de cálcio, amarelo-clara.

**3.7 – Fluorescência Artificial ou Secundária** – este tipo de fluorescência é produzido pela coloração com corantes fluorescentes chamados fluorocromos, capazes de corar especificamente certas estruturas ou componentes celulares. Um fluorocromo muito utilizado é o acridine ou alaranjado de acridina que possui afinidade pelos ácidos nucléicos, corando o DNA de verde e amarelo, e o RNA de vermelho ou alaranjado. O isocianato de fluoresceína é

um outro fluorocromo utilizado na marcação de anticorpos e posteriormente sua pesquisa e localização nas células, tecidos ou órgãos.

**3.8 – Microscopia de Polarização** – é realizada mediante o uso de instrumentos acessórios denominados polarizador e analisador, que são fabricados de folha de polaróide ou de prismas de Nicol. O polarizador é montado abaixo do condensador e envia luz polarizada, em plano, para o objeto. O analisador é colocado sobre a objetiva (no diafragma da ocular) ou acima desta lente. A microscopia de polarização permite demonstrar e reorientação de partículas ultramicroscópicas e deduzir detalhes sobre a organização submicroscópica celulares e teciduais. Quando se gira o analisador até torná-lo perpendicular ao polarizador, não passa luz, e o campo fica escuro. *Se as micelas (partículas de um sistema coloidal) da estrutura examinada tiverem orientação uniforme em todos os sentidos, o campo permanece escuro e se diz que o material é isotrópico.* Entretanto, se as micelas tiverem uma reorientação determinada, paralela ou perpendicular, ao grande eixo do objeto, aparecendo este iluminado e é anisotrópico ou birrefringente.

### **3.9 – Microscopia Eletrônica:**

**3.9.1 – Introdução** – historicamente, este tipo de microscopia está relacionado com a descoberta de elementos que nela são utilizados. As partículas elétricas foram descobertas por L Lorentz, físico holandês (1853–1.928), em 1.880 e os elétrons por J. J. Thomson, físico e matemático inglês (1.856–1.940), em 1.897. A natureza do elétron foi estabelecida por Luiz de Broglie, físico francês (nascido em 1.892), em 1.923. Com os trabalhos deste físico, chegou-se a conclusão de que um microscópio utilizando um feixe de elétrons em lugar da luz visível deveria ter um poder de resolução muito elevado em virtude do mínimo comprimento de onda de feixe eletrônico. Foi desse modo, que Knoll e Ruska em fevereiro e março de 1.931 obtiveram as primeiras imagens da microscopia eletrônica, com aumento de apenas 17 vezes, mas com os princípios básicos de aumento da óptica eletrônica bem estabelecidos.

Em 1.935, o primeiro microscópio eletrônico comercial, o EM1, foi construído por Martin para a **Metropolitan Vickers Electrical Company**, da Inglaterra. A produção em série de microscópios eletrônicos foi conseguida pela primeira vez em 1.938 por Von Borries e Ruska na **Siemens e Halske Company de Berlim**. Durante a Segunda Grande Guerra (1.939–45) a evolução do microscópio eletrônico foi de uma certa forma prejudicada, embora o modelo

RCA–B tivesse aparecido nos Estados Unidos e em 1.040 Von Ardenne tivesse construído um modelo universal avançado, com resolução de 30 A°, recorde para a época.

No período pós–guerra, o progresso que se fez, principalmente nos métodos de preparo de material para a microscopia eletrônica intensificou um rápido desenvolvimento, sendo ela hoje essencial para estudos nos vários campos da ciência, como na Metalurgia, Cristalografia, Física Eletrônica e Biologia, entre outros.

### **3.9.2 – Tipos de Microscopia Eletrônica:**

**A – Microscopia Eletrônica de Transmissão** – atualmente, este tipo de microscopia convencional relatado de denominado “**de transmissão**”. Para diferenciar um segundo tipo de evolução, que ver–se–á a seguir.

**B – Microscopia Eletrônica de Varredura** – neste tipo de microscopia eletrônica, cognominado “**de varredura**”, a imagem eletrônica mostra apenas detalhes superficiais dos objetos examinados, sem haver necessidade desses serem cortados e sem que o feixe eletrônico os atravesse. Apenas é estudada a morfologia superficial dos objetos, mostrando detalhes de saliências ou protuberâncias e reentrâncias deles. Portanto, esses dois tipos atuais de microscopia eletrônica vem contribuindo enormemente para o conhecimento da estrutura íntima do mundo animado e inanimado.

**Nota – este texto é, na realidade, uma breve introdução, por isso queremos esclarecer aos interessados no assunto, que para obter o texto na íntegra (total), basta solicitá-lo, que atenderemos todos os pedidos e enviaremos os mesmos pelos Correios e Telégrafos; portanto, entre em contato conosco através dos nossos telefones ou e-mail.**

**À Direção.**

**Maceió, Janeiro de 2.012**

**Autor: Mário Jorge Martins.**

**Prof. Adjunto de Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL).**

**Mestre em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).**

**Médico da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA).**