

Tabela 3.2 Resumo dos vários tipos de microscópio			
Tipo de microscópio	Características	Imagem característica	Principais usos
<b>Varredura por sonda</b> Tunelamento	Utiliza uma fina sonda de metal que varre a amostra e produz uma imagem que revela as protuberâncias e depressões dos átomos na superfície da amostra. A potência de resolução é muito maior que a de um microscópio eletrônico. Uma preparação especial não é necessária.	 <p>Proteína RecA de <i>E. coli</i></p> <p>MT 5 nm</p>	Fornece imagens muito detalhadas das moléculas no interior das células.
Força atômica	Utiliza uma sonda de metal e diamante que é levemente pressionada ao longo da superfície da amostra, produzindo uma imagem tridimensional. Uma preparação especial não é necessária.	 <p>Toxina perfringocina O de <i>Clostridium perfringens</i></p> <p>MFA 11 nm</p>	Fornece imagens tridimensionais de moléculas biológicas em alta resolução, em detalhes a um nível quase atômico, e pode avaliar propriedades físicas de amostras biológicas e processos moleculares.

## Preparação de amostras para microscopia óptica

### OBJETIVOS DO APRENDIZADO

- 3-7** Diferenciar um corante ácido de um corante básico.
- 3-8** Explicar o propósito da coloração simples.
- 3-9** Listar as etapas na preparação de uma coloração de Gram, descrevendo a aparência das células gram-positivas e gram-negativas após cada etapa.
- 3-10** Comparar e contrastar a coloração de Gram e a coloração resistente a álcool-ácido.
- 3-11** Explicar por que cada uma das seguintes colorações é usada: coloração da cápsula, coloração do endosporo, coloração dos flagelos.

Como a maioria dos micro-organismos aparece quase incolor quando observada através de um microscópio óptico padrão, muitas vezes devemos prepará-los para a observação. Uma das formas pelas quais isso pode ser é através da coloração da amostra. A seguir, discutiremos vários procedimentos de coloração diferentes.

### Preparando esfregaços para coloração

A maioria das observações iniciais dos micro-organismos é feita por meio de preparações coradas. **Coloração** significa simplesmente corar os micro-organismos com um corante que enfatize certas

estruturas. Porém, antes que os micro-organismos possam ser corados, devem ser **fixados** (aderidos) à lâmina do microscópio. A fixação simultaneamente mata os micro-organismos e os fixa na lâmina. Ela também preserva várias partes dos micróbios em seu estado natural com apenas um mínimo de distorção.

Quando uma amostra precisa ser fixada, um filme delgado de material contendo os micro-organismos é espalhado sobre a superfície da lâmina. Esse filme, denominado **esfregaço**, é deixado secar ao ar. Na maioria dos procedimentos de coloração, a lâmina é então fixada pela passagem, várias vezes, sobre a chama de um bico de Bunsen, com o lado do esfregaço para cima, ou recobrimo a lâmina com álcool metílico por um minuto. A coloração é aplicada e então lavada com água; a seguir, a lâmina é seca com papel absorvente. Sem a fixação, a coloração poderia lavar os micróbios da lâmina. Os micro-organismos corados estão agora prontos para o exame microscópico.

Os corantes são sais compostos por um íon positivo e um íon negativo, um dos quais é colorido e conhecido como **chromóforo**. A cor dos assim chamados **corantes básicos** está no íon positivo; em **corantes ácidos**, está no íon negativo. As bactérias são levemente carregadas negativamente em pH 7. Desse modo, o íon positivo colorido em um corante básico é aderido à célula bacteriana carregada negativamente. Os corantes básicos, que incluem o cristal violeta, o azul de metileno, o verde de malaquita e a safranina, são mais comumente usados que os corantes ácidos. Os corantes ácidos não são

atraídos pela maioria dos tipos de bactérias porque os íons negativos do corante são repelidos pela superfície bacteriana carregada negativamente; assim, a coloração cora o fundo. A preparação de bactérias incolores contra um fundo corado é denominada **coloração negativa**. Ela é valiosa para a observação geral de formas da célula, tamanhos e cápsulas, pois as células tornam-se altamente visíveis contra um fundo escuro contrastante (veja a Figura 3.14a na página 72). As distorções do tamanho e da forma da célula são minimizadas porque a fixação não é necessária e as células não captam a coloração. Exemplos de corantes ácidos são a eosina, a fucsina ácida e a nigrosina.

Para aplicar corantes ácidos ou básicos, os microbiologistas utilizam três tipos de técnicas de coloração: simples, diferencial e especial.

## Colorações simples

Uma **coloração simples** é uma solução aquosa ou alcoólica de um único corante básico. Embora diferentes corantes se liguem especificamente a diferentes partes das células, o objetivo primário de uma coloração simples é destacar todo o micro-organismo, para que as formas celulares e as estruturas básicas fiquem visíveis. A coloração é aplicada ao esfregão fixo por certo período de tempo, e então lavada; a lâmina é seca e examinada. Algumas vezes, uma substância química é adicionada à solução para intensificar a coloração; este aditivo é denominado **mordente**. Uma função do mordente é aumentar a afinidade de uma coloração por uma amostra biológica; outra é revestir uma estrutura (como um flagelo) para torná-la mais espessa e mais fácil de ser vista após ser corada. Alguns dos corantes simples comumente usados em laboratório são o azul de metileno, a carbolfucsina, o cristal violeta e a safranina.

### TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Por que um corante negativo não cora uma célula? **3-7**
- ✓ Por que a fixação é necessária na maioria dos procedimentos de coloração? **3-8**

## Colorações diferenciais

Ao contrário das colorações simples, as **colorações diferenciais** reagem de modo distinto com diferentes tipos de bactérias, podendo assim ser usadas para diferenciá-las. As colorações diferenciais mais frequentemente utilizadas para bactérias são a coloração de Gram e a coloração álcool-ácido resistente.

### Coloração de Gram

A **coloração de Gram** foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram. Ela é um dos procedimentos de coloração mais úteis, pois classifica as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas.

Neste procedimento (Figura 3.12a),

- 1 Um esfregão fixado pelo calor é recoberto com um corante básico púrpura, geralmente o cristal violeta. Uma vez que a coloração púrpura impregna todas as células, ela é denominada **coloração primária**.
- 2 Após um curto período de tempo, o corante púrpura é lavado, e o esfregão é recoberto com iodo, um mordente. Quando o

iodo é lavado, ambas as bactérias gram-positivas e gram-negativas aparecem em cor violeta escuro ou púrpura.

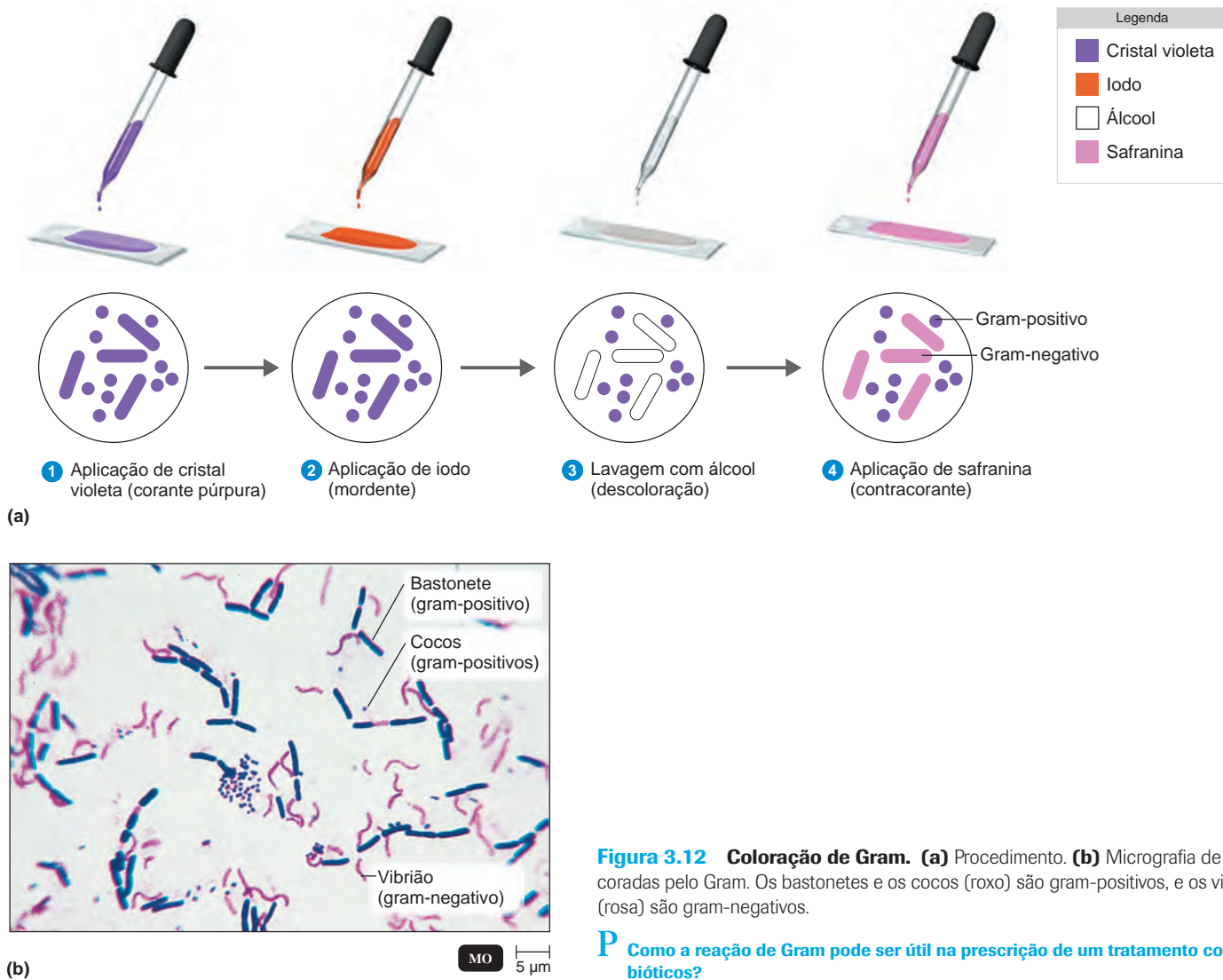
- 3 A seguir, a lâmina é lavada com álcool ou uma solução de álcool-acetona. Essa solução é um **agente descolorante**, que remove o púrpura das células de algumas espécies, mas não de outras.
- 4 O álcool é lavado, e a lâmina é então corada com safranina, um corante básico vermelho. O esfregão é lavado novamente, seco com papel e examinado microscopicamente.

O corante púrpura e o iodo se combinam no citoplasma de cada bactéria, corando-a de violeta escuro ou púrpura. As bactérias que retêm essa cor após a tentativa de descolori-las com álcool são classificadas como **gram-positivas**; as bactérias que perdem a cor violeta escuro ou púrpura após a descoloração são classificadas como **gram-negativas** (Figura 3.12b). Como as bactérias gram-negativas são incolores após a lavagem com álcool, elas não são mais visíveis. É por isso que o corante básico safranina é aplicado; ele cora a bactérias gram-negativas de rosa. Os corantes como a safranina, que possuem uma cor contrastante com a coloração primária, são denominados **contracorantes**. Como as bactérias gram-positivas retêm a cor púrpura original, não são afetadas pelo contracorante safranina.

Como você verá no Capítulo 4, os diferentes tipos de bactérias reagem de modo distinto à coloração de Gram, pois diferenças estruturais em suas paredes celulares afetam a retenção ou a liberação de uma combinação de cristal violeta e iodo, denominada complexo cristal violeta-iodo (CV-I). Entre outras diferenças, as bactérias gram-positivas possuem uma parede celular de peptidoglicano mais espessa (dissacarídeos e aminoácidos) que as bactérias gram-negativas. Além disso, as bactérias gram-negativas contêm uma camada de lipopolissacarídeo (lipídeos e polissacarídeos) como parte de sua parede celular (veja a Figura 4.13, página 86). Quando aplicados a células gram-positivas e gram-negativas, o cristal violeta e o iodo penetram facilmente nas células. Dentro das mesmas, o cristal violeta e o iodo se combinam para formar o CV-I. Esse complexo é maior que a molécula de cristal violeta que penetrou na célula e, devido a seu tamanho, não pode ser removido da camada intacta de peptidoglicano das células gram-positivas pelo álcool. Consequentemente, as células gram-positivas retêm a cor do corante cristal violeta. Nas células gram-negativas, contudo, a lavagem com álcool rompe a camada externa de lipopolissacarídeo, e o complexo CV-I é removido através da camada delgada de peptidoglicano. Como resultado, as células gram-negativas permanecem incolores até serem contracoradas com a safranina, quando adquirem a cor rosa.

Em resumo, as células gram-positivas retêm o corante e permanecem com a cor púrpura. As células gram-negativas não retêm o corante; elas ficam incolores até serem contracoradas com um corante vermelho.

O método de Gram é uma das mais importantes técnicas de coloração na microbiologia médica. Porém, os resultados da coloração de Gram não são universalmente aplicáveis, pois algumas células bacterianas coram-se fracamente ou não adquirem cor. A reação de Gram é mais consistente quando utilizada em bactérias jovens, em crescimento.



**Figura 3.12 Coloração de Gram.** (a) Procedimento. (b) Micrografia de bactérias coradas pelo Gram. Os bastonetes e os cocos (roxo) são gram-positivos, e os vibrões (rosa) são gram-negativos.

**P** Como a reação de Gram pode ser útil na prescrição de um tratamento com antibióticos?

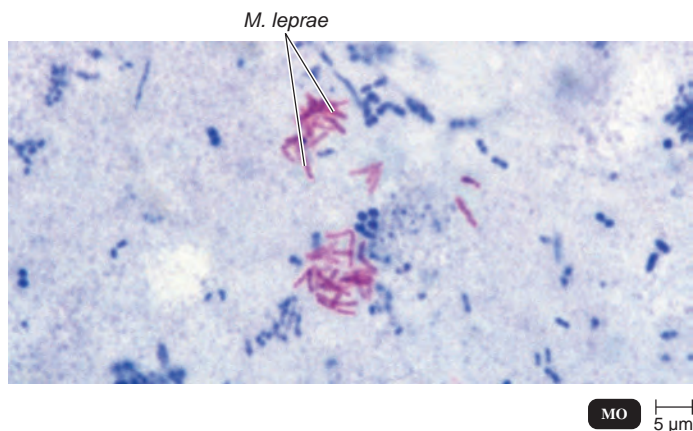
A reação de Gram de uma bactéria pode fornecer informações valiosas para o tratamento da doença. As bactérias gram-positivas tendem a ser mortas mais facilmente por penicilinas e cefalosporinas. As bactérias gram-negativas geralmente são mais resistentes porque os antibióticos não podem penetrar a camada de lipopolissacarídeo. Parte da resistência a estes antibióticos entre ambas as bactérias gram-positivas e gram-negativas é devida à inativação bacteriana dos antibióticos.

### Coloração álcool-ácido resistente

Outra importante coloração diferencial (que classifica as bactérias em grupos distintos) é a **coloração álcool-ácido resistente**, que se liga fortemente apenas a bactérias que possuem material céreo em suas paredes celulares. Os microbiologistas utilizam essa coloração para identificar todas as bactérias do gênero *Mycobacterium*, in-

cluindo os dois importantes patógenos *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose, e *Mycobacterium leprae*, o agente causador da lepra. Essa coloração também é usada para identificar as linhagens patogênicas do gênero *Nocardia*. As bactérias dos gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia* são álcool-ácido resistentes.

**P&R** No procedimento de coloração álcool-ácido resistente, o corante vermelho carbolfucsina é aplicado a um esfregaço fixado, e a lâmina é aquecida levemente por vários minutos. (O calor aumenta a penetração e a retenção do corante.) A seguir, a lâmina é resfriada e lavada com água. O esfregaço é tratado com álcool-ácido, um descolorante, que remove o corante vermelho das bactérias que não são álcool-ácido resistentes. Os micro-organismos álcool-ácido resistentes retêm a cor vermelha, pois a carbolfucsina é mais solúvel nos lipídeos da parede celular que no álcool-ácido (**Figura 3.13**). Em bactérias que não são álcool-ácido



**Figura 3.13 Bactérias álcool-ácido resistentes (BAAR).** As bactérias *Mycobacterium leprae* que infectaram este tecido foram coradas de vermelho com uma coloração álcool-ácido. As células que não são álcool-ácido resistentes estão coradas com o contracorante azul de metileno.

**P** Nomeie duas doenças que podem ser diagnosticadas utilizando-se a coloração álcool-ácido resistente.

resistentes, cujas paredes celulares não possuem os componentes lipídicos, a carbolfucsina é rapidamente removida durante a descoloração, deixando as células incolores. O esfregaço é então corado com o contracorante azul de metileno. As células que não são álcool-ácido resistentes ficam azuis após a aplicação do contracorante.

### TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Por que a coloração de Gram é tão útil? **3-9**
- ✓ Qual coloração poderia ser utilizada para identificar micróbios dos gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia*? **3-10**

### Colorações especiais

As **colorações especiais** são usadas para corar e isolar partes específicas dos micro-organismos, como os endosporos e os flagelos, e para revelar a presença de cápsulas.

#### Coloração negativa para cápsulas

Muitos micro-organismos contêm um revestimento gelatinoso denominado **cápsula**, que discutiremos em nosso exame da célula procariótica, no Capítulo 4. Na microbiologia médica, a demonstração da presença de uma cápsula é um modo de determinar a **virulência** do organismo, o grau em que um patógeno pode causar doença.

A coloração da cápsula é mais difícil que outros tipos de procedimentos de coloração, pois os materiais capsulares são solúveis em água e podem ser desalojados ou removidos durante uma lavagem rigorosa. Para demonstrar a presença de cápsulas, um mi-

crobiologista pode misturar as bactérias em uma solução contendo uma fina suspensão coloidal de partículas coradas (geralmente com tinta nanquim ou nigrosina), para fornecer um fundo contrastante e então corar as bactérias com uma coloração simples, como a safranina (**Figura 3.14a**). Devido à sua composição química, as cápsulas não reagem com a maioria dos corantes, como a safranina, e desse modo aparecem como halos circundando cada célula bacteriana.

#### Coloração para endosporos (esporos)

Um **endosporo** é uma estrutura especial resistente, dormente, formada dentro de uma célula que protege uma bactéria das condições ambientais adversas. Embora os endosporos sejam relativamente incomuns nas células bacterianas, podem ser formados por alguns gêneros de bactérias. Os endosporos não podem ser corados pelos métodos comuns, como a coloração simples e a coloração de Gram, pois os corantes não penetram a parede do endosporo.

A coloração mais comumente usada para endosporos é a *técnica de Schaeffer-Fulton* (**Figura 3.14b**). O verde malaquita, a coloração primária, é aplicado a um esfregaço fixado com calor e aquecido em vapor por cerca de cinco minutos. O calor auxilia a coloração a penetrar na parede do endosporo. Então, a preparação é lavada por cerca de 30 segundos com água, para remover o verde malaquita de todas as partes da célula, exceto dos endosporos. A seguir, a safranina, um contracorante, é aplicada ao esfregaço para corar as porções da célula que não os endosporos. Em um esfregaço corretamente preparado, os endosporos aparecem em verde dentro de células vermelhas ou rosadas. Como os endosporos são altamente refrativos, podem ser detectados no microscópio óptico quando não corados, mas não podem ser diferenciados de inclusões de material armazenado sem uma coloração especial.

#### Coloração dos flagelos

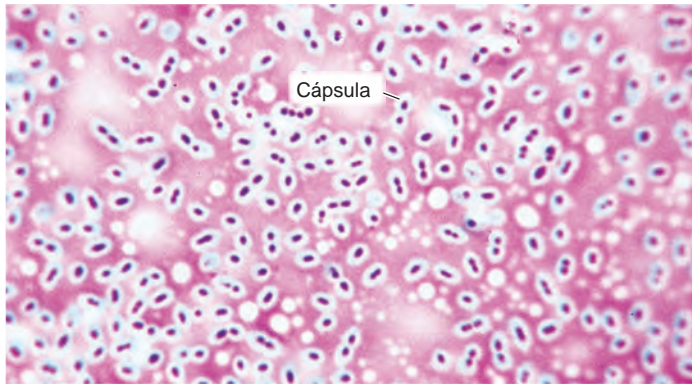
Os **flagelos** bacterianos são estruturas de locomoção muito pequenas para serem visualizadas com um microscópio óptico sem coloração. Um procedimento tedioso e delicado de coloração utiliza um mordente e o corante carbolfucsina para aumentar os diâmetros dos flagelos até que eles se tornem visíveis no microscópio óptico (**Figura 3.14c**). Os microbiologistas utilizam o número e o arranjo dos flagelos como auxiliares de diagnóstico.

### TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ De que maneira os endosporos não corados aparecem? E os endosporos corados? **3-11**

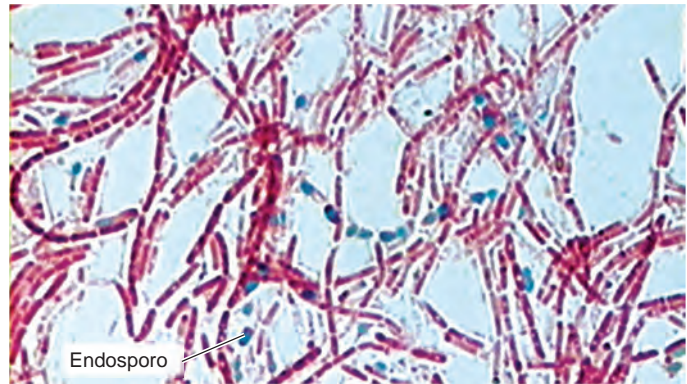
\*\*\*

Um resumo das colorações é apresentado na **Tabela 3.3**. Nos próximos capítulos, examinaremos melhor as estruturas dos micróbios e como eles se protegem, nutrem e reproduzem.



(a) Coloração negativa.

MO 5 µm



(b) Coloração para endosporos.

MO 5 µm

**Figura 3.14 Colorações especiais.** (a) A coloração da cápsula fornece um fundo contrastante; assim, as cápsulas dessa bactéria, *Klebsiella pneumoniae*, apresentam-se como áreas claras circundando as células coradas. (b) Os endosporos são vistos como formas ovais verdes nessas células em forma de bastão da bactéria *Bacillus cereus*, utilizando-se a coloração de Schaeffer-Fulton para endosporos. (c) Os flagelos aparecem como extensões ondulantes a partir das extremidades dessa célula da bactéria *Spirillum volutans*. Em relação ao corpo da célula, os flagelos encontram-se muito mais espessos que o normal, pois ocorreu o acúmulo de camadas do corante devido ao tratamento da amostra com um mordente.

**P** Qual a importância das cápsulas, dos endosporos e dos flagelos para as bactérias?



(c) Coloração para flagelos.

MO 5 µm

Tabela 3.3 Resumo de várias colorações e seus usos	
Coloração	Principais usos
<b>Simples</b> (azul de metileno, carbofucsina, cristal violeta, safranina)	Utilizada para destacar os micro-organismos e para determinar as formas e os arranjos celulares. Uma solução aquosa ou alcoólica de um único corante básico cora as células. (Algumas vezes, um mordente é adicionado para intensificar a coloração.)
<b>Diferencial</b> Gram	Utilizada para distinguir diferentes tipos de bactérias. Classifica as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas. As bactérias gram-positivas retêm o corante cristal violeta e adquirem a cor púrpura. As bactérias gram-negativas não retêm o cristal violeta e permanecem incolores, até serem contracoradas com safranina, quando adquirem a cor rosa.
Álcool-ácido resistente	Utilizada para distinguir espécies de <i>Mycobacterium</i> e algumas espécies de <i>Nocardia</i> . As bactérias álcool-ácido resistentes, uma vez coradas com carbofucsina e tratadas com álcool-ácido, permanecem vermelhas, pois retêm o corante carbofucsina. As bactérias álcool-ácido sensíveis, quando coradas e tratadas da mesma forma e a seguir coradas com azul de metileno, adquirem a cor azul, pois perdem a carbofucsina e são então capazes de aceitar o corante azul de metileno.
<b>Especial</b>	Utilizada para corar e isolar várias estruturas, como cápsulas, endosporos e flagelos; algumas vezes usada como auxiliar de diagnósticos.
Negativa	Utilizada para demonstrar a presença de cápsulas. Uma vez que as cápsulas não reagem com a maioria dos corantes, apresentam-se como halos incolores em torno das células bacterianas, destacando-se contra um fundo escuro.
Endosporos	Utilizada para detectar a presença de endosporos nas bactérias. Quando o verde malaquita é aplicado a um esfregaço de células bacterianas fixado pelo calor, o corante penetra nos endosporos e os cora de verde. Quando a safranina (vermelha) é adicionada, cora o restante da célula de vermelho ou rosa.
Flagelos	Utilizada para demonstrar a presença de flagelos. Um mordente é usado para aumentar os diâmetros dos flagelos até que se tornem visíveis microscopicamente quando corados com carbofucsina.