

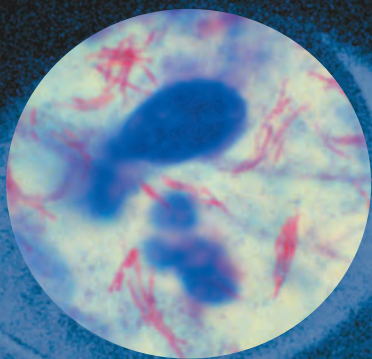
3

Observando Micro-organismos Através do Microscópio

Os micro-organismos são pequenos demais para serem vistos a olho nu, devendo ser observados através de um microscópio. O termo *microscópio* é derivado da palavra em latim *micro*, que significa pequeno, e da palavra em grego *skopos*, olhar. Os microbiologistas modernos utilizam microscópios que produzem, com grande clareza, ampliações que são milhares de vezes maiores do que as da lente única de van Leeuwenhoek (veja a Figura 1.2b na página 7). Este capítulo descreve como funcionam os diferentes tipos de microscópios e por que um tipo pode ser utilizado preferencialmente a outro.

Alguns micróbios são mais facilmente observáveis que outros, devido ao seu tamanho maior ou a características. Muitos micróbios, entretanto, devem ser submetidos a vários procedimentos de coloração antes que suas paredes celulares, cápsulas e outras estruturas percam seu estado natural incolor. A última parte deste capítulo explica alguns dos métodos mais comumente utilizados na preparação de amostras para exame através de um microscópio óptico.

Você deve estar se perguntando como iremos classificar, contar e medir as amostras que serão estudadas. Para responder a essa pergunta, este capítulo inicia com uma discussão sobre como utilizar o sistema métrico para medir os micróbios.



SOB O MICROSCÓPIO

Mycobacterium tuberculosis é o agente causador da tuberculose.

P&R

A coloração resistente a álcool-ácido do escarro de um paciente é um método rápido, confiável e barato para diagnosticar a tuberculose. Com qual cor as células bacterianas aparecem se o paciente tiver tuberculose?

Procure pela resposta neste capítulo.

Unidades de medida

OBJETIVO DO APRENDIZADO

- 3-1** Listar as unidades métricas utilizadas para medir os micro-organismos.

Como os micro-organismos e seus componentes são muito pequenos, eles são medidos em unidades que não são familiares para muitos de nós em nossa vida diária. Quando medimos os micro-organismos, utilizamos o sistema métrico. A unidade-padrão de comprimento no sistema métrico é o metro (m). Uma grande vantagem do sistema métrico é que as unidades estão relacionadas umas às outras por fatores de 10. Desse modo, 1 m equivale a 10 decímetros (dm) ou 100 centímetros (cm) ou 1.000 milímetros (mm). As unidades do sistema de medida dos Estados Unidos não possuem a vantagem da fácil conversão por um único fator de 10. Por exemplo, os norte-americanos utilizam 3 pés ou 36 polegadas que equivalem a 1 jarda.

Os micro-organismos e seus componentes estruturais são medidos em unidades ainda menores, como os micrômetros e os nanômetros. Um **micrômetro (µm)** é igual a 0,000001 m (10^{-6} m). O prefixo *micro* indica que a unidade seguinte deve ser dividida por 1 milhão, ou 10^6 (veja a seção sobre Notação Exponencial no Apêndice B). Um **nanômetro (nm)** é igual a 0,000000001 m (10^{-9} m). Angström (Å) era usado antigamente para representar 10^{-10} m, ou 0,1 nm.

A **Tabela 3.1** apresenta as unidades métricas básicas de comprimento e alguns de seus equivalentes do sistema norte-americano. Na Tabela 3.1, você pode comparar as unidades microscópicas de medida com as unidades macroscópicas comumente conhecidas, como centímetros, metros e quilômetros. Se você examinar a Figura 3.2 na página 58, verá os tamanhos relativos de vários organismos na escala métrica.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Se um micróbio mede 10 µm de comprimento, o quanto isso é em nanômetros? **3-1**

Microscopia: os instrumentos

OBJETIVOS DO APRENDIZADO

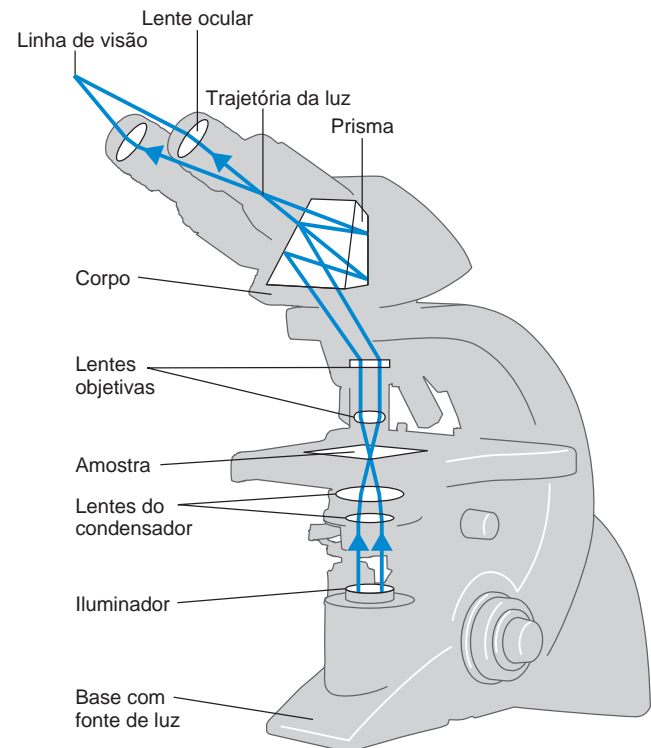
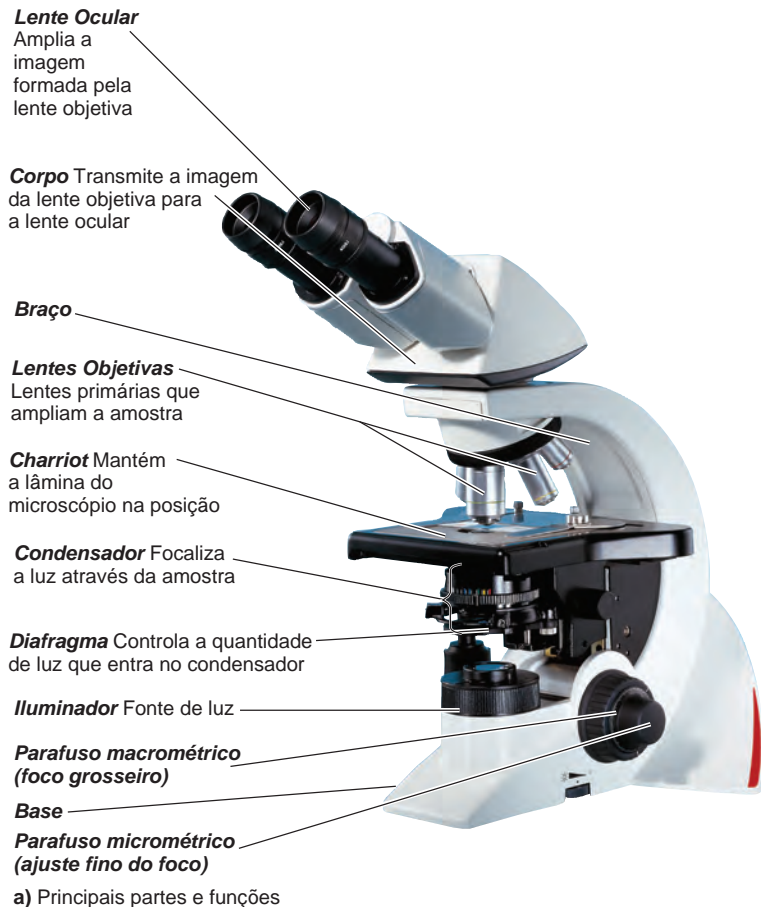
- 3-2** Fazer um diagrama da trajetória da luz através de um microscópio composto.
- 3-3** Definir *ampliação total e resolução*.
- 3-4** Identificar um uso para as microscopias de campo escuro, de contraste de fase, de contraste por interferência diferencial, de fluorescência, confocal, de dois fótons e de varredura acústica, e compará-las com a iluminação de campo claro.
- 3-5** Explicar qual a diferença entre a microscopia eletrônica e a microscopia óptica.
- 3-6** Identificar um uso para os microscópios MET, MEV e o microscópio de varredura por sonda.

O microscópio simples utilizado por van Leeuwenhoek no século XVII possuía somente uma lente e era similar a uma lupa. Entretanto, van Leeuwenhoek foi o melhor polidor de lentes no mundo em sua época. Suas lentes eram polidas com tal precisão que uma única lente podia ampliar um micróbio em 300 vezes. Seus microscópios simples permitiram que ele fosse a primeira pessoa a ver as bactérias (veja a Figura 1.2, página 7).

Os contemporâneos de van Leeuwenhoek, como Robert Hooke, construíram microscópios compostos, que possuem múltiplas lentes. Na verdade, é creditada a um fabricante holandês de binóculos, Zaccharias Janssen, a produção do primeiro microscópio composto por volta de 1600. Entretanto, esses microscópios compostos iniciais eram de pouca qualidade e não podiam ser usados para se observar bactérias. Foi somente em 1830 que um microscópio significativamente melhor foi desenvolvido por Joseph Jackson Lister (o pai de Joseph Lister). Várias melhorias no microscópio de Lister resultaram no desenvolvimento do microscópio composto moderno, do tipo usado em laboratórios de microbiologia atualmente. Os estudos microscópicos de espécimes vivos revelaram interações dramáticas entre os micróbios (veja o quadro Aplicações da Microbiologia na página 57).

Tabela 3.1 Unidades métricas de comprimento e equivalentes dos Estados Unidos

Unidade métrica	Significado do prefixo	Equivalente métrico	Equivalente dos Estados Unidos
1 quilômetro (km)	<i>quilo</i> = 1.000	1.000 m = 10^3 m	3.280,84 pés ou 0,62 milhas; 1 milha = 1,61 km
1 metro (m)		Unidade-padrão de medida	39,37 polegadas ou 3,28 pés ou 1,09 jardas
1 decímetro (dm)	<i>deci</i> = 1/10	0,1 m = 10^{-1} m	3,94 polegadas
1 centímetro (cm)	<i>centi</i> = 1/100	0,01 m = 10^{-2} m	0,394 polegadas; 1 polegada = 2,54 cm
1 milímetro (mm)	<i>mili</i> = 1/1.000	0,001 m = 10^{-3} m	
1 micrômetro (µm)	<i>micro</i> = 1/1.000.000	0,000001 m = 10^{-6} m	
1 nanômetro (nm)	<i>nano</i> = 1/1.000.000.000	0,000000001 m = 10^{-9} m	
1 picômetro (pm)	<i>pico</i> = 1/1.000.000.000.000	0,000000000001 m = 10^{-12} m	



b) Trajetória da luz (de baixo para cima)

Figura 3.1 O microscópio óptico composto.

P Como é calculada a ampliação total de um microscópio óptico composto?

Microscopia óptica

Microscopia óptica refere-se ao uso de qualquer tipo de microscópio que utilize luz para observar amostras. Neste capítulo examinaremos vários tipos de microscopia óptica.

Microscopia óptica composta

Um **microscópio óptico composto (MO)** moderno possui uma série de lentes e utiliza a luz visível como fonte de iluminação (**Figura 3.1a**). Com um microscópio óptico composto, podemos examinar amostras muito pequenas, bem como parte de seus detalhes. Uma série de lentes finamente polidas (**Figura 3.1b**) forma uma imagem claramente focada, que é muitas vezes maior que a amostra em si. Essa ampliação é obtida quando os raios de luz de um **iluminador**, a fonte de luz, passam através de um **condensador**, que possui lentes que direcionam os raios de luz através da amostra. A seguir, os raios de luz passam para as **lentes objetivas**, as lentes mais próximas da amostra. A imagem da amostra é novamente ampliada pela **lente ocular**.

Podemos calcular a **ampliação total** de uma amostra multiplicando a ampliação (alcance) da lente objetiva pela ampliação (alcance) da lente ocular. A maior parte dos microscópios utilizados

em microbiologia possui várias lentes objetivas, incluindo 10× (baixo alcance), 40× (alto alcance) e 100× (imersão em óleo, que será descrita em breve). A maioria das lentes oculares amplia as amostras por um fator de 10. Multiplicando-se a ampliação de uma lente objetiva específica pela ampliação da lente ocular, veremos que a ampliação total seria de 100× para as lentes de baixo alcance, 400× para as de alto alcance e 1.000× para a imersão em óleo. Alguns microscópios ópticos compostos podem alcançar uma ampliação de 2.000× com as lentes de imersão em óleo.

A **resolução** (também chamada de *potência de resolução*) é a capacidade das lentes de diferenciar detalhes e estruturas. Especificamente, refere-se à capacidade das lentes de diferenciar entre dois pontos separados a uma determinada distância. Por exemplo, se um microscópio possui uma potência de resolução de 0,4 nm, pode distinguir entre dois pontos se eles estiverem separados por uma distância de pelo menos 0,4 nm. Um princípio geral da microscopia é que, quanto mais curto o comprimento de onda da luz utilizada no instrumento, maior a resolução. A luz branca utilizada em um microscópio óptico composto possui um comprimento de onda relativamente longo e não pode determinar estruturas menores que 0,2 μm. Esse fato e outras considerações práticas limitam a ampliação

O que é este limo?

Quando as bactérias crescem, frequentemente permanecem juntas em grupos chamados de biofilmes. Isso pode resultar no filme viscoso encontrado em rochas, alimentos, dentro de tubos e em dispositivos médicos implantados. As células bacterianas interagem e exibem organização multicelular (Figura A).

Pseudomonas aeruginosa pode crescer dentro de um ser humano sem causar doença até formar um biofilme que ataca o sistema imune do hospedeiro. As bactérias *P. aeruginosa* formadoras de biofilme colonizam os pulmões de pacientes com fibrose cística e são uma das principais causas de morte nesses pacientes (Figura B). Talvez os biofilmes que causam doenças possam ser prevenidos por novas drogas que destroem o indutor (discutido em breve).

Mixobactérias

As mixobactérias são encontradas em material orgânico em decomposição e água doce em todo o mundo. Embora sejam bactérias, muitas

Figura A *Paenibacillus*. À medida que uma pequena colônia se afasta da colônia parental, outros grupos de células seguem a primeira colônia. Logo, todas as outras bactérias juntam-se ao deslocamento para formar essa colônia espiralada.



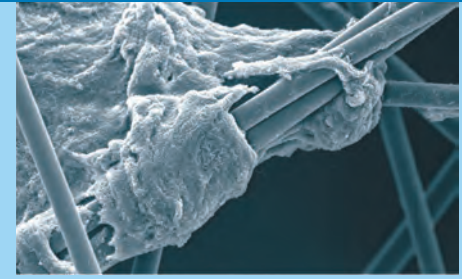
never exist as individual cells. As cells of *Myxococcus xanthus* seem to "hunt" in groups. In their natural aquatic habitat, the cells of *M. xanthus* form spherical colonies that surround a "prey" (a bacterium), where they can secrete digestive enzymes and absorb nutrients. On solid substrates, cells of mixobacteria slide over a solid surface, leaving trails of mucus that are followed by other cells. When food is scarce, the cells aggregate to form a mass. Cells in the interior of the mass differentiate into fruiting bodies that consist of mucous stalks and spore arrangements, as shown in Figure C.

Vibrio

Vibrio fischeri is a bioluminescent bacterium that lives as a symbiont in the light-producing organ of the squid and certain fish. When free-living, the bacteria find themselves in low concentration and do not emit light. However, when they grow in their hosts, they are found in high concentrations, and each cell is induced to produce the enzyme luciferase, used in the chemical pathway of bioluminescence.

Como funciona o comportamento de grupos bacterianos

Cellular density changes the expression of genes in bacterial cells in a process called quorum sensing (quorum sensor). In short, a quorum represents the minimum number of members necessary to conduct the negotiations. Quorum sensing is the ability of bacteria to communicate and coordinate their behavior. Bacteria that use quorum sensing produce and secrete a chemical signal called an inducer. As the inducer spreads



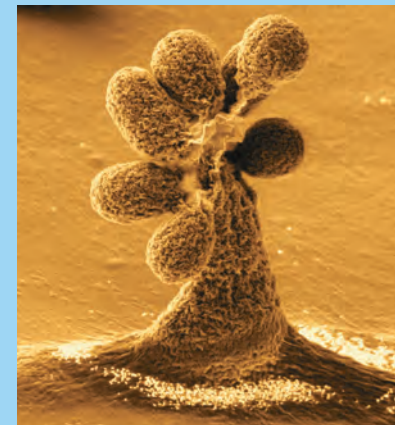
5 μm

MO

Figura B Biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

for the surrounding medium, other bacterial cells move toward the source and begin to produce the inducer. As the concentration of the inducer increases with the number of cells, which, in turn, attract more cells and initiate the synthesis of more inducer.

Figura C Um corpo de frutificação de uma mixobactéria.



10 μm

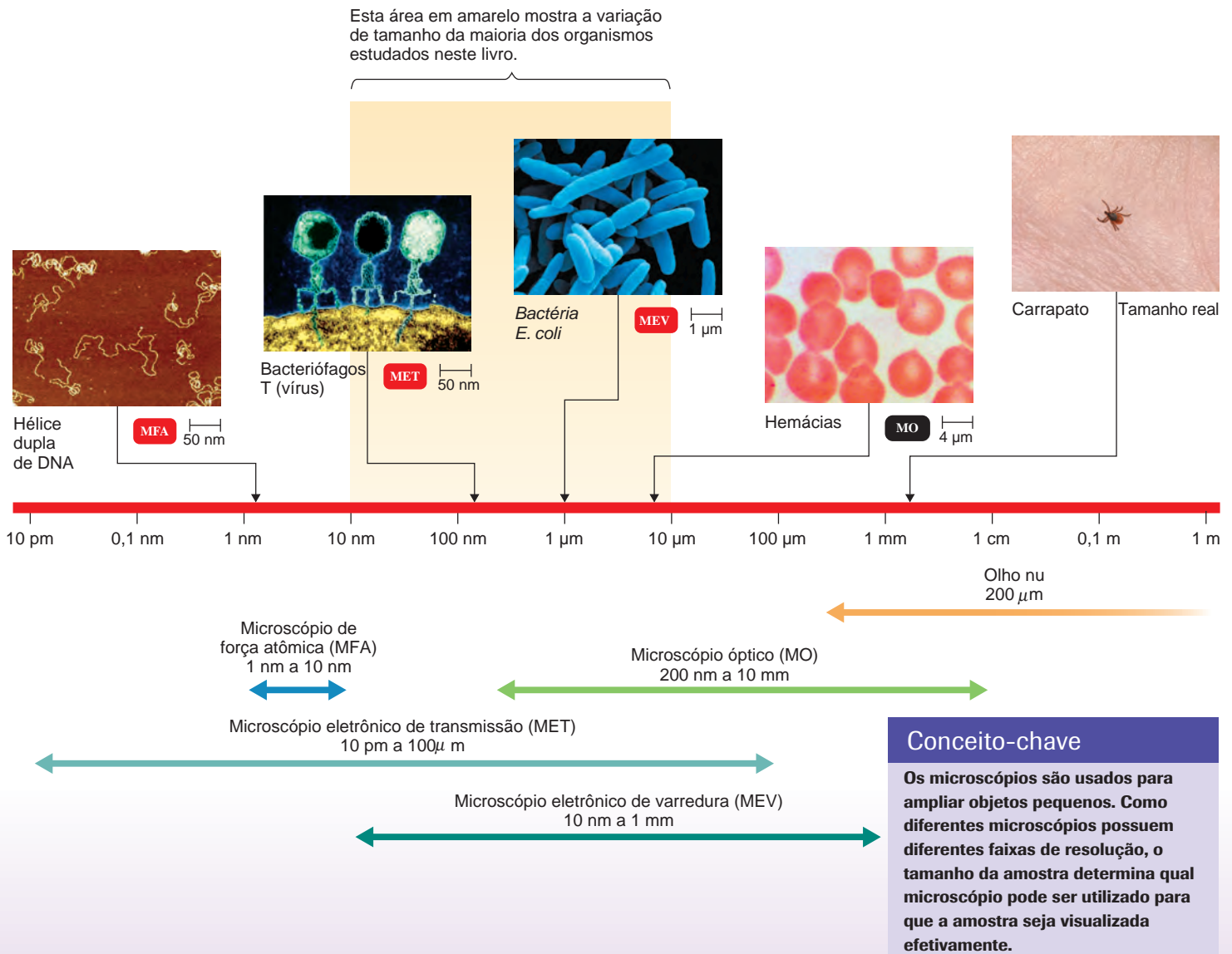
MEV



Figura 3.2

FIGURA FUNDAMENTAL Tamanhos e resoluções

Esta figura ilustra dois conceitos: 1) os tamanhos relativos de várias amostras, e 2) a resolução do olho humano e de diversos microscópios. As micrografias incluídas em todo o livro (como as apresentadas a seguir) apresentarão escalas de referência e símbolos para ajudá-lo a identificar o tamanho real da amostra e o tipo de microscópio utilizado na imagem. Um símbolo vermelho indica que a micrografia foi colorida artificialmente. Veja a Tabela 3.2 nas páginas 66 a 68 para mais explicações.



ção obtida até mesmo pelo melhor microscópio óptico composto a cerca de 2.000×. Comparando, os microscópios de van Leeuwenhoek possuíam uma resolução de 1 µm.

A Figura 3.2 apresenta várias amostras que podem ser visualizadas pelo olho humano, pelo microscópio óptico e pelo microscópio eletrônico.

Para se obter uma imagem clara e finalmente detalhada em um microscópio óptico composto, as amostras devem ser preparadas para contrastarem nitidamente com o seu meio (substância na qual elas estão suspensas). Para atingir esse contraste, devemos alterar o índice de refração das amostras em relação ao índice de seu meio. O **índice de refração** é a medida da capacidade

de curvatura da luz em um meio. Alteramos o índice de refração das amostras por coloração, um procedimento que discutiremos em breve. Os raios de luz se movem em uma linha reta através de um meio único. Após a coloração, quando os raios de luz passam através dos dois materiais (a amostra e seu meio) com diferentes índices de refração, os raios mudam de direção (sofrem refração) a partir de uma linha reta, se curvando ou mudando o ângulo no limite entre os materiais, aumentando o contraste da imagem entre a amostra e o meio. À medida que os raios de luz seguem para longe das amostras, eles se espalham e entram na lente objetiva, e a imagem é assim ampliada.

Para alcançar uma alta ampliação (1.000×) com boa resolução, a lente objetiva deve ser pequena. Embora necessitemos que a luz percorra a amostra e o meio para ser refratada de modo diferente, não desejamos perder os raios de luz após a sua passagem através da amostra corada. Para preservar a direção dos raios de luz na maior ampliação, óleo de imersão é colocado entre a lâmina de vidro e a lente objetiva de imersão (Figura 3.3). O óleo de imersão possui o mesmo índice de refração que o vidro, e dessa forma torna-se parte da óptica do vidro do microscópio. A menos que o óleo de imersão seja utilizado, os raios de luz são refratados à medida que penetram no ar sobre a lâmina, e a lente objetiva precisaria ter um diâmetro maior para capturar a maior parte deles. O óleo possui o mesmo efeito que o aumento do diâmetro da lente objetiva; portanto, ele melhora a potência de resolução das lentes. Se o óleo não for usado com uma lente objetiva de imersão, a imagem torna-se borrada, com baixa resolução.

Sob condições normais de funcionamento, o campo de visão em um microscópio óptico composto é claramente iluminado. Ao focalizar a luz, o condensador produz uma **iluminação de campo claro** (Figura 3.4a).

Nem sempre é desejável corar uma amostra. Entretanto, uma célula não corada possui pouco contraste em relação a o que a cerca, sendo assim difícil de ser visualizada. Células não coradas são mais facilmente observadas com os microscópios compostos modificados descritos na próxima seção.

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Através de quais lentes a luz passa em um microscópio composto? **3-2**
- ✓ O que significa quando o microscópio possui uma resolução de 0,2 nm? **3-3**

Microscopia de campo escuro

Um **microscópio de campo escuro** é utilizado para examinar micro-organismos vivos que são invisíveis ao microscópio óptico comum, que não podem ser corados por métodos-padrão ou que são tão distorcidos pela coloração que suas características não podem ser identificadas. Em vez do condensador normal, um microscópio de campo escuro utiliza um condensador de campo escuro, que contém um disco opaco. O disco bloqueia a luz que poderia entrar na lente objetiva diretamente. Somente a luz que é refletida para fora (devolvida) da amostra entra na lente objetiva. Uma vez que não há luz de fundo direta, a amostra aparece iluminada contra um fundo preto – o campo escuro (Figura 3.4b). Essa técnica é frequen-

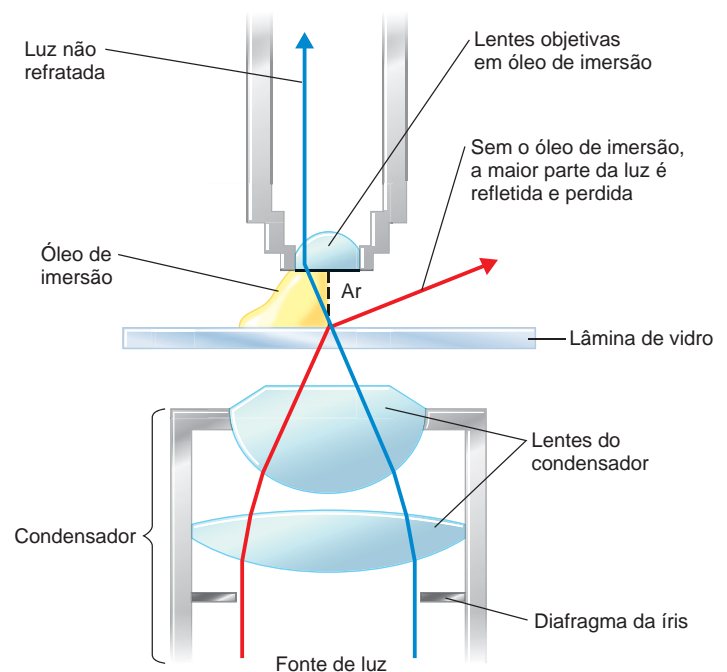


Figura 3.3 Refração no microscópio composto, utilizando uma lente objetiva em óleo de imersão. Como os índices de refração da lâmina de vidro e do óleo de imersão são os mesmos, os raios de luz não são refratados quando passam de um meio para o outro, quando uma lente objetiva em óleo de imersão é usada. Este método produz imagens com melhor resolução em ampliações maiores que 900×.

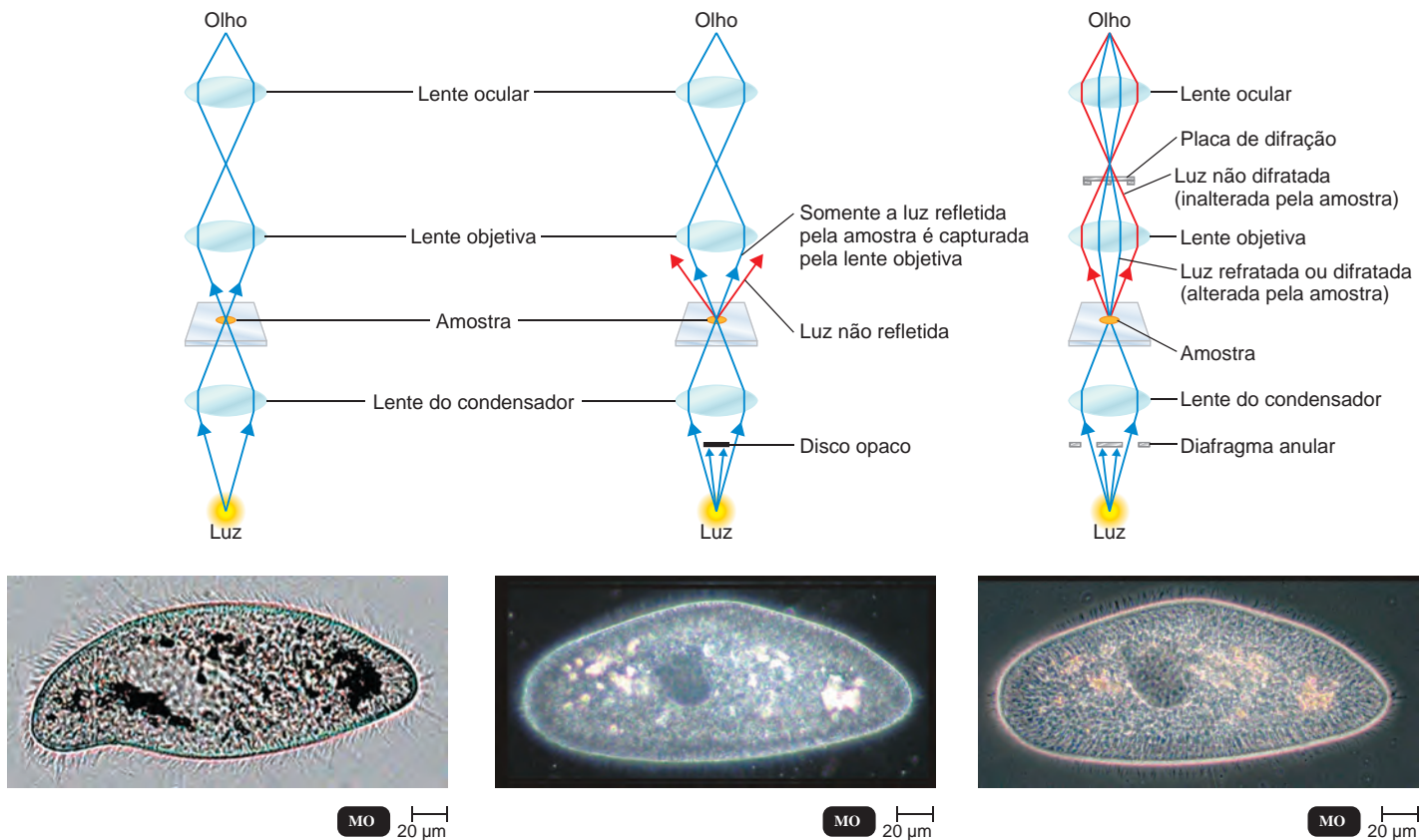
P O que significa resolução?

temente utilizada para examinar micro-organismos não corados suspensos em líquido. Uma utilização da microscopia de campo escuro é o exame de espiroquetas muito finas, como o *Treponema pallidum*, o agente causador da sífilis.

Microscopia de contraste de fase

Outro modo de se observar micro-organismos é com um **microscópio de contraste de fase**. A microscopia de contraste de fase é especialmente útil, pois permite um exame detalhado das estruturas internas de micro-organismos vivos. Além disso, não é necessária a fixação (fixar os micróbios à lâmina do microscópio) ou a coloração da amostra – procedimentos que poderiam distorcer ou matar os micro-organismos.

O princípio da microscopia de contraste de fase baseia-se na natureza das ondas dos raios de luz e no fato de que os raios luminosos podem estar *em fase* (seus picos e vales combinam) ou *fora de fase*. Se o pico de onda dos raios luminosos de uma fonte coincide com o pico de onda da outra fonte, os raios interagem para produzir *reforço* (brilho relativo). Entretanto, se o pico de onda de uma fonte luminosa coincide com a parte inferior da onda de outra fonte de luz, os raios interagem para produzir *interferência* (escuridão relativa). Em um microscópio de contraste de fase, um conjunto de raios luminosos sai diretamente da fonte



a) Campo claro (No alto) A trajetória da luz na microscopia de campo claro e o tipo de iluminação produzida pelos microscópios ópticos compostos comuns. (Acima) A iluminação de campo claro mostra as estruturas internas e o contorno da película transparente (revestimento externo).

b) Campo escuro (No alto) O microscópio de campo escuro utiliza um condensador especial com um disco opaco que elimina toda a luz no centro do feixe. A única luz que atinge a amostra vem em ângulo; assim, somente a luz refletida pela amostra (raios azuis) alcança a lente objetiva. (Acima) Contra o fundo preto visto na microscopia de campo escuro, as bordas da célula estão brilhantes, algumas estruturas internas parecem brilhar e a película é quase visível.

c) Contraste de fase (No alto) Na microscopia de contraste de fase, a amostra é iluminada pela luz que passa através de um diafragma anular (em forma de anel). Os raios de luz diretos (inalterados pela amostra) percorrem uma trajetória diferente dos raios luminosos que são refletidos ou difratados à medida que passam através da amostra. Esses dois conjuntos de raios são combinados no olho. A luz refletida ou difratada é indicada em azul; os raios diretos estão em vermelho. (Acima) A microscopia de contraste de fase mostra uma diferenciação maior das estruturas internas e também mostra claramente a película.

Figura 3.4 Microscopia de campo claro, campo escuro e contraste de fase. As ilustrações mostram as diferentes trajetórias de luz de cada um desses tipos de microscopia. As fotografias comparam o mesmo espécime de *Paramecium* utilizando essas três diferentes técnicas de microscopia.

P Quais são as vantagens da microscopia de campo claro, campo escuro e contraste de fase?

de luz. O outro conjunto é derivado da luz que é refletida ou difratada de uma estrutura particular na amostra. (*Difração* é a dispersão dos raios luminosos quando eles “tocam” a borda de uma amostra. Os raios difratados são curvados para longe dos raios de luz paralelos que passam mais distante da amostra.) Quando os dois conjuntos de raios de luz – diretos e refletidos ou refratados – são reunidos, formam uma imagem da amostra na lente ocular, contendo áreas que são relativamente claras (em fase) e vários tons de cinza até a cor preta (fora de fase; **Figura 3.4c**). Na microscopia de contraste de fase, as estruturas internas de uma célula tornam-se mais bem definidas.

Microscopia de contraste com interferência diferencial

A **microscopia de contraste com interferência diferencial (CID)** é similar à microscopia de contraste de fase, pois utiliza as diferenças nos índices de refração. Entretanto, um microscópio CID utiliza dois feixes de luz em vez de um. Além disso, prismas separam cada feixe de luz, adicionando cores contrastantes à amostra. Assim, a resolução de um microscópio CID é maior que a de um microscópio de contraste de fase padrão. A imagem também apresenta cores brilhantes e parece quase tridimensional (**Figura 3.5**).



Figura 3.5 Microscopia de contraste com interferência diferencial (CID). Assim como no contraste de fase, a CID utiliza as diferenças nos índices de refração para produzir uma imagem, neste caso o protozoário *Paramecium*. As cores na imagem são produzidas por prismas que dividem os dois feixes de luz usados neste processo.

P Por que a resolução de um microscópio CID é maior que a de um microscópio de contraste de fase?

Microscopia de fluorescência

A **microscopia de fluorescência** vale-se da **fluorescência**, a capacidade das substâncias de absorver curtos comprimentos de ondas de luz (ultravioleta) e produzir luz em um comprimento de onda maior (visível). Alguns organismos fluorescem naturalmente sob iluminação ultravioleta; se a amostra que será visualizada não fluorescer naturalmente, ela pode ser corada com um grupo de corantes fluorescentes denominados *fluorocromos*. Quando os micro-organismos corados com um fluorocromo são examinados sob um microscópio de fluorescência, com uma fonte de luz ultravioleta ou próxima da ultravioleta, eles parecem luminosos, objetos brilhantes contra um fundo escuro.

Os fluorocromos possuem atrações especiais por diferentes micro-organismos. Por exemplo, o fluorocromo auramina O, que apresenta um brilho amarelo quando exposto à luz ultravioleta, é fortemente absorvido pelo *Mycobacterium tuberculosis*, a bactéria que causa a tuberculose. Quando o corante é aplicado a uma amostra de material com suspeita de conter a bactéria, esta pode ser detectada pelo surgimento de organismos amarelo-brilhantes contra um fundo escuro. O *Bacillus anthracis*, o agente causador do antraz, adquire cor verde-maçã quando corado com outro fluorocromo, o isotiocianato de fluoresceína (FITC).

O principal uso da microscopia de fluorescência é uma técnica diagnóstica denominada **técnica de anticorpo fluorescente (AF)** ou **imunofluorescência**. Os **anticorpos** são moléculas de defesa natural que são produzidas pelos seres humanos e muitos animais em reação a uma substância estranha, ou **antígeno**. Os anticorpos fluorescentes para um antígeno específico são obtidos da seguinte forma: um animal é injetado com um antígeno específico, como uma bactéria; o animal então começa a produzir anticorpos contra aquele antígeno. Após um período suficiente, os anticorpos são removidos do soro do animal. A seguir, como mostrado na **Figura 3.6a**, um fluorocromo é quimicamente combinado com os anticorpos. Esses anticorpos fluorescentes são então adicionados a uma

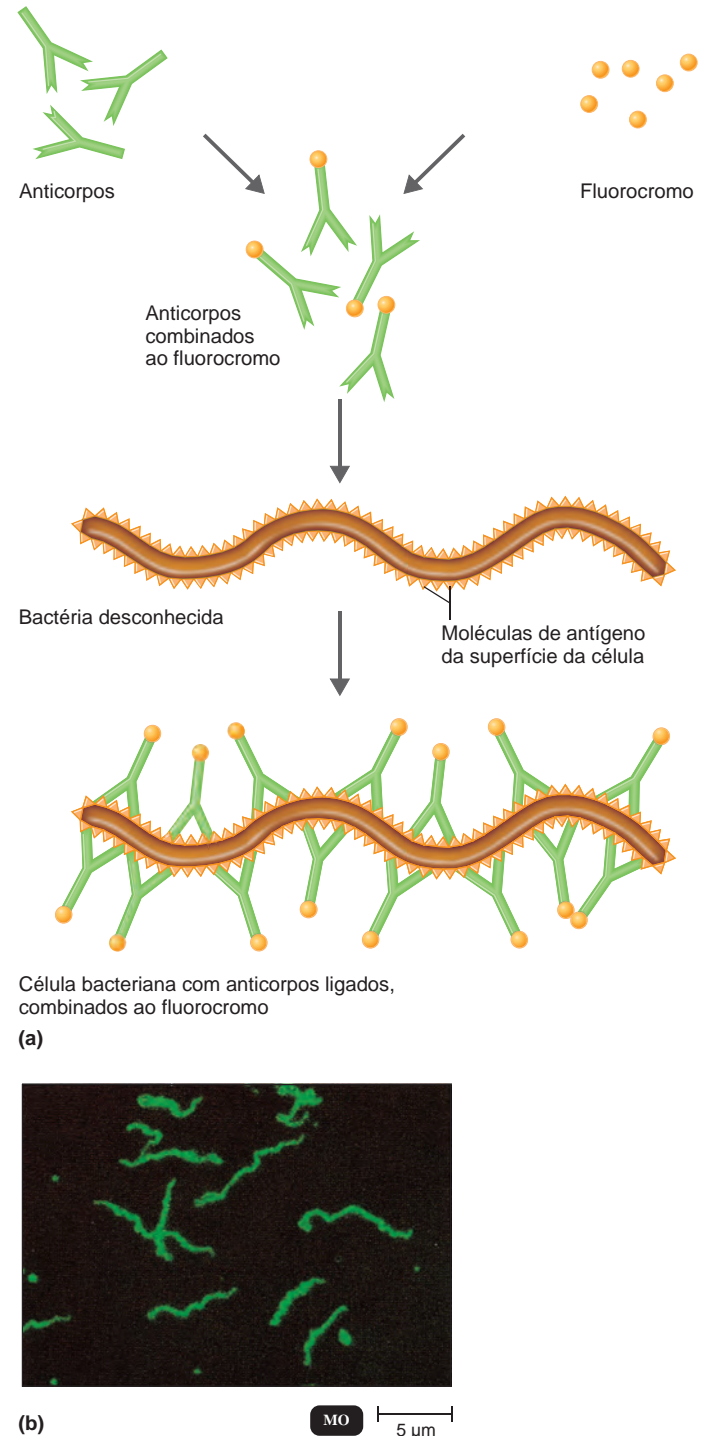


Figura 3.6 O princípio da imunofluorescência. (a) Um tipo de fluorocromo é combinado a anticorpos contra um tipo específico de bactéria. Quando a preparação é adicionada às células bacterianas em uma lâmina, os anticorpos se fixam às células bacterianas, e as células fluorescem quando iluminadas com luz ultravioleta. **(b)** No teste de absorção de anticorpo treponêmico fluorescente (FTA-ABS) para a sífilis mostrado aqui, o *Treponema pallidum* é evidenciado como células verdes contra um fundo escuro.

P Por que as outras bactérias não fluorescem no teste FTA-ABS?



Figura 3.7 Microscopia confocal. A microscopia confocal produz imagens tridimensionais e pode ser usada para examinar o interior de células. Nesta figura são mostrados vacúolos contráteis no *Paramecium multimicronucleatum*.

P Que característica da microscopia confocal elimina o desfoque que ocorre com outros microscópios?

lâmina de microscópio contendo uma bactéria desconhecida. Se essa bactéria desconhecida for a mesma bactéria que foi injetada no animal, os anticorpos fluorescentes se ligarão aos antígenos na superfície da bactéria, fazendo com que ela fluoresça.

Essa técnica pode detectar bactérias e outros micro-organismos patogênicos, mesmo dentro de células, tecidos ou outras amostras clínicas (Figura 3.6b). Além disso, pode ser utilizada para identificar um micróbio em minutos. A imunofluorescência é especialmente útil no diagnóstico da sífilis e da raiva. Discutiremos mais sobre as reações antígeno-anticorpo e sobre imunofluorescência no Capítulo 18.

Microscopia confocal

Microscopia confocal é uma técnica na microscopia óptica utilizada para reconstruir imagens tridimensionais. Assim como na microscopia de fluorescência, as amostras são coradas com fluorocromos para que emitam, ou devolvam, a luz. Contudo, em vez da iluminação do campo todo, na microscopia confocal um plano de uma pequena região da amostra é iluminado com uma luz de pequeno comprimento de onda (azul), que passa a luz devolvida através de uma abertura alinhada com a região iluminada. Cada plano corresponde a uma imagem de um corte fino que foi fisicamente seccionado a partir de uma amostra. Os planos e as regiões sucessivos são iluminados até que toda a amostra tenha sido examinada. Uma vez que a microscopia confocal utiliza um orifício pequeno de abertura (*pinhole*), elimina o desfoque que ocorre com outros microscópios. Como resultado, imagens bidimensionais excepcionalmente claras podem ser obtidas, com uma resolução até 40% melhor que a dos outros microscópios.

A maioria dos microscópios confocais é utilizada em conjunto com computadores para construir imagens tridimensionais. Os planos examinados de uma amostra, que lembram um arquivo de imagens, são convertidos a um formato digital que pode ser utilizado por um computador para construir uma representação tridimensional. As imagens reconstruídas podem ser movidas e visualizadas em qualquer orientação. Essa técnica tem sido usada para obter imagens tridimensionais de células inteiras e de componentes celulares (Figura 3.7). Além disso, a microscopia confocal pode ser utilizada para avaliar a fisiologia celular, monitorando as distribuições e as concentrações de substâncias como o ATP e os íons cálcio.

Microscopia de dois fótons

Da mesma maneira que na microscopia confocal, na **microscopia de dois fótons (MDF)** as amostras são coradas com um fluorocromo. A microscopia de dois fótons utiliza uma luz de comprimento de onda longo (vermelha), e dessa forma dois fótons, em vez de um, são necessários para excitar o fluorocromo para emitir luz. O comprimento de onda mais longo permite a imagem de células vivas em tecidos de até 1 mm de espessura (Figura 3.8). A microscopia confocal pode formar imagens de células em detalhes somente a uma espessura menor que 100 µm. Além disso, o comprimento de onda mais longo tem menor probabilidade de formar o oxigênio singlet, que danifica as células (veja a página 161). Outra vantagem da MDF é que ela pode rastrear a atividade das células em tempo real. Por exemplo, células do sistema imune foram observadas respondendo a um antígeno.

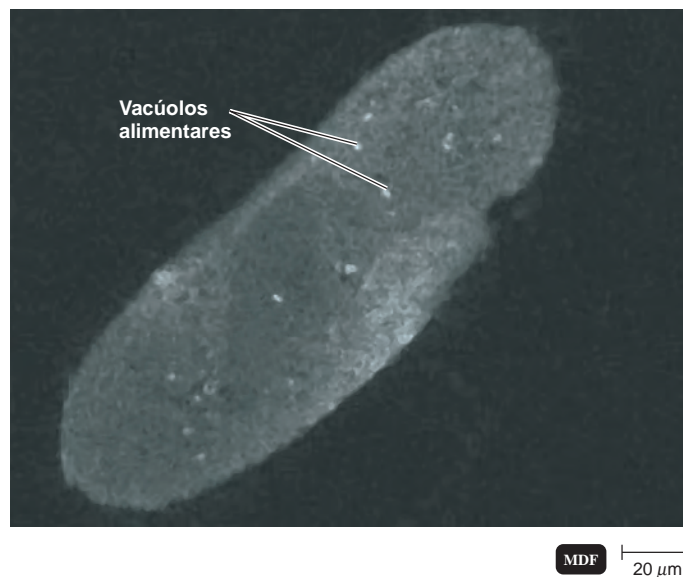


Figura 3.8 Microscopia de dois fótons (MDF). Esse procedimento torna possível a obtenção de imagens de células vivas de até 1 mm de espessura em detalhes. Esta imagem mostra o movimento dos vacúolos alimentares em um *Paramecium* vivo.

P Quais são as vantagens da MDF?

Microscopia acústica de varredura

A **microscopia acústica de varredura (MAV)** basicamente consiste em interpretar a ação de uma onda sonora enviada através de uma amostra. Uma onda sonora de uma frequência específica propaga-se através da amostra, e uma parte dessa onda é refletida de volta toda vez que atinge uma interface dentro do material. A resolução é de cerca de 1 μm . A MAV é usada para estudar células vivas aderidas a outra superfície, como células cancerígenas, placas ateroscleróticas e biofilmes bacterianos que obstruem equipamentos (Figura 3.9).

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Em que as microscopias de campo claro, campo escuro, contraste de fase e fluorescência são similares? 3-4

Microscopia eletrônica

Objetos menores que 0,2 μm , como vírus ou estruturas internas das células, devem ser examinados com um **microscópio eletrônico**. Na microscopia eletrônica, um feixe de elétrons é usado ao invés da luz. Como a luz, os elétrons livres se deslocam em ondas. A potência de resolução do microscópio eletrônico é muito maior que a dos outros microscópios descritos até agora. A melhor resolução dos microscópios eletrônicos é devida aos comprimentos de onda mais curtos dos elétrons; os comprimentos de onda dos elétrons são cerca de 100 mil vezes menores que os comprimentos de onda da luz visível. Portanto, os microscópios eletrônicos são usados para examinar estruturas muito pequenas para serem determinadas com microscópios ópticos. As imagens produzidas por microscópios eletrônicos são sempre em preto e branco, mas podem ser coloridas artificialmente para acentuar certos detalhes.

Ao invés de usar lentes de vidro, um microscópio eletrônico utiliza lentes eletromagnéticas para focalizar um feixe de elétrons na amostra. Existem dois tipos de microscópios eletrônicos: o microscópio eletrônico de transmissão e o microscópio eletrônico de varredura.

Microscopia eletrônica de transmissão

No **microscópio eletrônico de transmissão (MET)**, um feixe de elétrons finamente focalizado de um canhão de elétrons passa através de um corte ultrafino da amostra, especialmente preparado (Figura 3.10a). O feixe é focalizado em uma pequena área da amostra por uma lente de condensador eletromagnética, que realiza uma função aproximadamente igual à do condensador de um microscópio óptico – direcionar o feixe de elétrons em uma linha reta para iluminar a amostra.

Os microscópios eletrônicos utilizam lentes eletromagnéticas para controlar a iluminação, o foco e a ampliação. Ao invés de ser colocada em uma lâmina de vidro, como nos microscópios ópticos, a amostra normalmente é colocada sobre uma tela de cobre. O feixe de elétrons passa através da amostra e então através de uma lente objetiva eletromagnética, que amplia a imagem. Finalmente, os elétrons são focalizados por uma lente projetora eletromagnética (em vez de uma lente ocular como no microscópio óptico) sobre uma tela fluorescente ou placa fotográfica. A imagem final, denominada

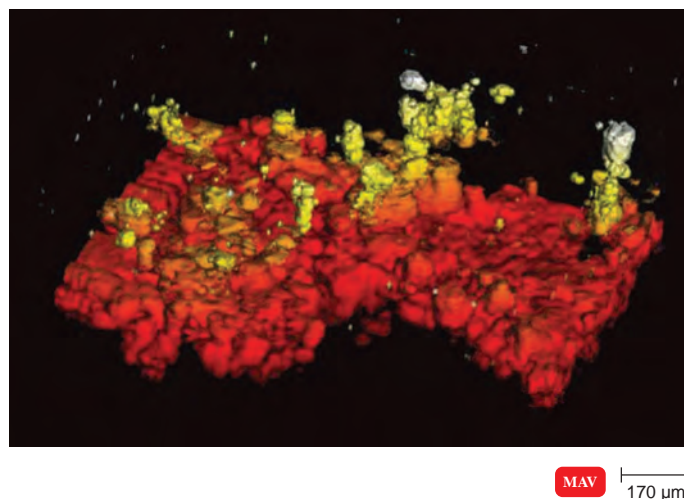


Figura 3.9 Microscopia acústica de varredura (MAV) de um biofilme bacteriano em uma lâmina. A microscopia acústica de varredura consiste essencialmente na interpretação da ação de ondas sonoras através da amostra.

P Qual o principal uso da MAV?

micrografia eletrônica de transmissão, aparece como muitas áreas iluminadas e escuras, dependendo do número de elétrons absorvidos pelas diferentes áreas da amostra.

Na prática, o microscópio eletrônico de transmissão pode determinar objetos tão próximos quanto 2,5 nm, e os objetos geralmente são ampliados de 10.000 a 100.000 \times . Como a maioria das amostras microscópicas é muito fina, o contraste entre as suas ultraestruturas e o fundo é fraco. O contraste pode ser amplamente aumentado utilizando-se um “corante” que absorve os elétrons e produz uma imagem mais escura na região corada. Sais de vários metais pesados, como o chumbo, o ósmio, o tungstênio e o urânio, são comumente usados como corantes. Esses materiais podem ser fixados na amostra (*coloração positiva*) ou usados para aumentar a opacidade eletrônica do campo circundante (*coloração negativa*). A coloração negativa é útil para o estudo de amostras muito pequenas, como as partículas virais, os flagelos bacterianos e as moléculas de proteína.

Além da coloração positiva e negativa, um micróbio pode ser visualizado por uma técnica denominada *projeção de sombras*. Nesse procedimento, um metal pesado, como a platina ou o ouro, é pulverizado em um ângulo de 45°, para que atinja o micróbio somente por um lado. O metal se acumula de um lado da amostra, e a área não atingida no lado oposto da amostra deixa uma área clara atrás dela, como uma sombra. Isso dá um efeito tridimensional à amostra e fornece uma ideia geral do tamanho e da forma da mesma (veja MET na Figura 4.6, página 80).

A microscopia eletrônica de transmissão tem alta resolução e é extremamente valiosa para o exame de diferentes camadas das amostras. Contudo, ela possui algumas desvantagens. Como os elétrons possuem uma potência limitada de penetração, somente um corte muito delgado de uma amostra (cerca de 100 nm) pode

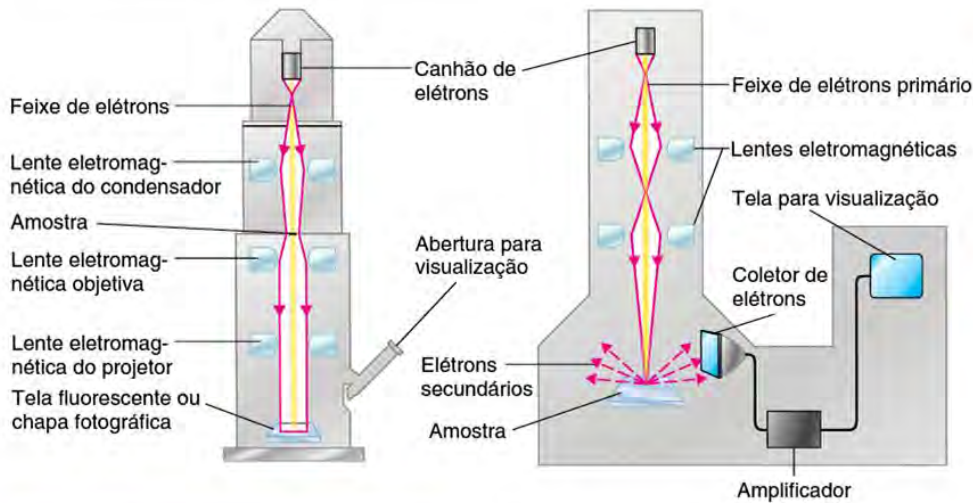


Figura 3.10 Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. As ilustrações mostram as trajetórias dos feixes de elétrons usados para criar imagens das amostras. As fotografias mostram um *Paramecium* visto com ambos os tipos de microscópios eletrônicos. Embora as micrografias eletrônicas normalmente sejam pretas e brancas, neste livro essas e outras micrografias eletrônicas foram coloridas artificialmente para dar ênfase.

P Em que diferem as imagens de MET e MEV do mesmo organismo?



MET 15 μm

(a) Transmissão. (No alto) Em um microscópio eletrônico de transmissão, os elétrons passam através da amostra e são dispersos. As lentes magnéticas focalizam a imagem em uma tela fluorescente ou placa fotográfica. (Acima) Esta micrografia eletrônica de transmissão (MET) colorida mostra um corte delgado de um *Paramecium*. Nesse tipo de microscopia, as estruturas internas presentes no corte podem ser observadas.



MEV 15 μm

(b) Varredura. (No alto) Em um microscópio eletrônico de varredura, os elétrons primários varrem a amostra e arrancam elétrons de sua superfície. Esses elétrons secundários são captados por um coletor, amplificados e transmitidos a uma tela de visualização ou chapa fotográfica. (Acima) Nesta micrografia eletrônica de varredura (MEV) colorida, as estruturas da superfície de um *Paramecium* podem ser observadas. Note o aspecto tridimensional desta célula, em contraste com o aspecto bidimensional da micrografia eletrônica de transmissão na parte (a).

ser efetivamente estudado. Desse modo, a amostra não tem aspecto tridimensional. Além disso, as amostras devem ser fixadas, desidratadas e visualizadas em alto vácuo para prevenir a dispersão dos elétrons. Esses tratamentos não somente matam a amostra como também causam encolhimento e distorção, algumas vezes de tal forma que pode parecer que há estruturas adicionais em uma célula preparada. As estruturas que surgem como resultado do método de preparação são denominadas *artefatos*.

Microscopia eletrônica de varredura

O **microscópio eletrônico de varredura (MEV)** supera o problema do corte associado ao microscópio eletrônico de transmissão. Um microscópio eletrônico de varredura fornece imagens tridimensionais impressionantes das amostras (**Figura 3.10b**). Na microscopia eletrônica de varredura, um canhão de elétrons produz um feixe de elétrons finamente focalizado, denominado

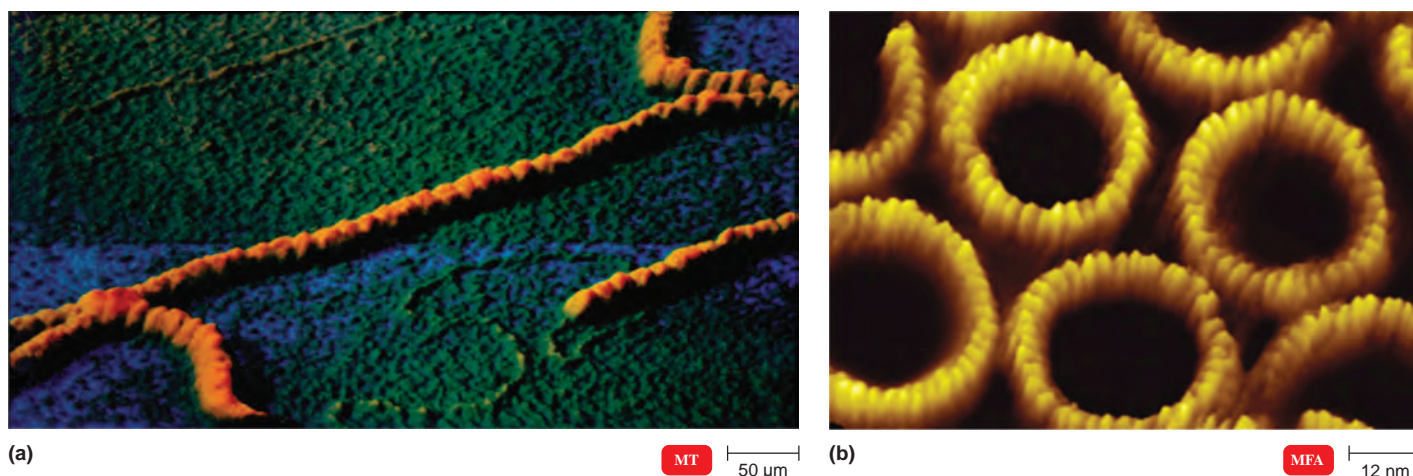


Figura 3.11 Microscopia de varredura por sonda. **(a)** Imagem da microscopia de tunelamento (MT) da proteína RecA de *E. coli*. Essa proteína está envolvida no reparo do DNA. **(b)** Imagem da microscopia de força atômica (MFA) da toxina perfringoglicina O de *Clostridium perfringens*. Essa toxina promove a formação de buracos em membranas plasmáticas.

P Qual é o princípio empregado na microscopia de varredura por sonda?

feixe eletrônico primário. Esses elétrons passam através de lentes eletromagnéticas e são dirigidos à superfície da amostra. O feixe primário de elétrons arranca elétrons da superfície da amostra, e os elétrons secundários produzidos são transmitidos a um coletor de elétrons, amplificados e usados para produzir uma imagem em uma tela ou chapa fotográfica. Essa imagem é chamada de *micrografia eletrônica de varredura*. Esse microscópio é especialmente útil no estudo das estruturas de superfície de células intactas e vírus. Na prática, ele pode determinar objetos tão próximos quanto 10 nm, e os objetos geralmente são ampliados de 1.000 a 10.000 \times .

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Por que os microscópios eletrônicos têm uma resolução melhor do que os microscópios ópticos? **3-5**

Microscopia de varredura por sonda

Desde o início da década de 1980, vários novos tipos de microscópios, denominados **microscópios de varredura por sonda**, têm sido desenvolvidos. Eles utilizam vários tipos de sondas para examinar em escala muito próxima a superfície de uma amostra sem modificá-la ou expô-la à radiação de alta energia. Esses microscópios podem ser usados para mapear formas atômicas e moleculares, caracterizar propriedades magnéticas e químicas e determinar as variações de temperatura no interior das células. Dentre os novos microscópios de varredura por sonda estão o microscópio de tunelamento e o microscópio de força atômica, discutidos a seguir.

Microscopia de tunelamento

A **microscopia de tunelamento (MT)** utiliza uma fina sonda metálica (tungstênio) que varre a amostra e produz uma imagem que revela protuberâncias e depressões dos átomos na superfície da amostra (**Figura 3.11a**). A potência de resolução de uma MT é muito maior que a de um microscópio eletrônico, podendo determinar detalhes que são apenas 1/100 do tamanho de um átomo. Além disso, não é necessária uma preparação especial da amostra para a observação. As MTs são usadas para fornecer imagens incrivelmente detalhadas de moléculas como o DNA.

Microscopia de força atômica

Na **microscopia de força atômica (MFA)**, uma sonda de metal e diamante é levemente pressionada sobre a superfície de uma amostra. À medida que a sonda se move ao longo da superfície da amostra, seus movimentos são registrados, e uma imagem tridimensional é produzida (**Figura 3.11b**). Assim como na MT, a MFA não requer uma preparação especial da amostra. A MFA é usada para fornecer imagens tanto de substâncias biológicas (em detalhes a nível quase atômico) (veja também a Figura 17.3b na página 480) quanto de processos moleculares (como a montagem da fibrina, um componente do coágulo sanguíneo).

Os vários tipos de microscopia descritos anteriormente estão resumidos na **Tabela 3.2** (páginas 66 a 68).

TESTE SEU CONHECIMENTO

- ✓ Para que a microscopia eletrônica de transmissão é usada? E a microscopia de varredura por sonda? **3-6**


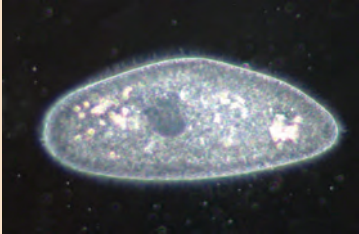


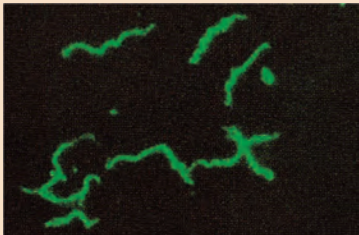
Tabela 3.2 Resumo dos vários tipos de microscópio			
Tipo de microscópio	Características	Imagem característica	Principais usos
Óptico Campo claro	Utiliza luz visível como fonte de iluminação; não pode determinar estruturas menores que $0,2 \mu\text{m}$; a amostra aparece contra um fundo claro. Barato e fácil de usar.	 <p><i>Paramecium</i> MO 25 μm</p>	Observar várias amostras coradas e contar micróbios; não determina amostras muito pequenas, como os vírus.
Campo escuro	Utiliza um condensador especial com um disco opaco que bloqueia a entrada de luz diretamente na lente objetiva; a luz refletida pela amostra entra na lente objetiva, e a amostra aparece clara contra um fundo preto.	 <p><i>Paramecium</i> MO 25 μm</p>	Examinar micro-organismos vivos que são invisíveis na microscopia de campo claro, que não se coram facilmente ou que são distorcidos pela coloração; frequentemente utilizado para detectar <i>Treponema pallidum</i> no diagnóstico da sífilis.
Contraste de fase	Utiliza um condensador especial contendo um diafragma anular (em forma de anel). O diafragma permite que a luz direta passe através do condensador, focalizando a luz na amostra e em uma placa de difração na lente objetiva. Os raios de luz diretos e refletidos ou difratados são reunidos para produzir a imagem. Não é necessária coloração.	 <p><i>Paramecium</i> MO 25 μm</p>	Facilitar o exame detalhado das estruturas internas das amostras vivas.
Contraste com interferência diferencial (CID)	Assim como o contraste de fase, utiliza as diferenças nos índices de refração para produzir imagens. Utiliza dois feixes de luz separados por prismas; a amostra aparece colorida como resultado do efeito do prisma. Não é necessária coloração.	 <p><i>Paramecium</i> MO 25 μm</p>	Fornecer imagens tridimensionais.
Fluorescência	Utiliza uma fonte de luz ultravioleta ou quase ultravioleta que leva à emissão de luz de compostos fluorescentes (de cor verde) em uma amostra.	 <p><i>Treponema pallidum</i> MO 5 μm</p>	Para técnicas de fluorescência com anticorpos (imunofluorescência), para detectar e identificar rapidamente os micróbios em tecidos ou amostras clínicas.

Tabela 3.2 Resumo dos vários tipos de microscópio

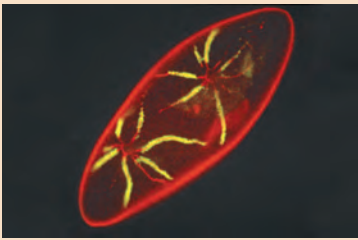
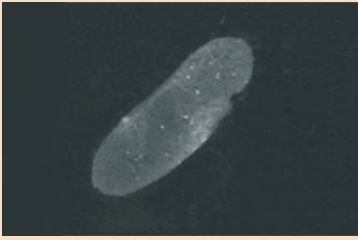
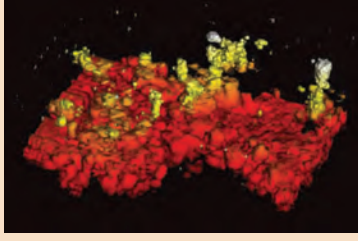


Tipo de microscópio	Características	Imagem característica	Principais usos
Confocal	Utiliza um único fóton para iluminar um plano da amostra de cada vez.	 <p><i>Paramecium</i> CF 22 μm</p>	Obter imagens bi e tridimensionais das células para aplicações biomédicas.
Dois fótons	Utiliza dois fótons para iluminar a amostra.	 <p><i>Paramecium</i> MDF 20 μm</p>	Formar imagens de células vivas, de até 1 mm de espessura, reduzir a fototoxicidade e observar a atividade celular em tempo real.
Acústica de varredura	Utiliza uma onda sonora de frequência específica que atravessa a amostra, com uma parte sendo refletida quando ela atinge uma interface dentro do material.	 <p><i>Biofilme</i> MAV 300 μm</p>	Examinar células vivas aderidas a outra superfície, como células cancerígenas, placas ateroscleróticas e biofilmes.
Eletrônico Transmissão	Utiliza um feixe de elétrons ao invés de luz; os elétrons passam através da amostra; devido ao comprimento de onda mais curto dos elétrons, estruturas menores que 0,2 μ m podem ser determinadas. A imagem produzida é bidimensional.	 <p><i>Paramecium</i> MET 25 μm</p>	Examinar vírus ou a ultraestrutura interna em cortes delgados de células (normalmente ampliadas em 10.000 a 100.000x).
Varredura	Utiliza um feixe de elétrons ao invés de luz; os elétrons são refletidos a partir do espécime; devido ao comprimento de onda mais curto dos elétrons, estruturas menores que 0,2 μ m podem ser determinadas. A imagem produzida é tridimensional.	 <p><i>Paramecium</i> MEV 25 μm</p>	Estudar as características de superfície das células e dos vírus (normalmente ampliadas em 1.000 a 10.000x).

Tabela 3.2 Resumo dos vários tipos de microscópio			
Tipo de microscópio	Características	Imagem característica	Principais usos
Varredura por sonda 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 recobrendo 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