

Brasília, DF / Novembro, 2024

Microscopia de luz – orientações básicas

Rosana Falcão⁽¹⁾, Guy de Capdeville⁽²⁾, Paula Fernandes Franco⁽³⁾ e Léia Cecília de Lima Fávoro⁽⁴⁾

⁽¹⁾Analista, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. ⁽²⁾Pesquisador, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. ⁽³⁾Analista, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. ⁽⁴⁾Pesquisadora, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.



Introdução

O microscópio de luz com óptica infinita que se conhece hoje é resultado de vários anos de desenvolvimentos, avanços tecnológicos e conhecimentos científicos envolvendo as áreas da óptica, matemática, física, eletrônica e engenharia. Um dos primeiros relatos do equipamento nomeado pela Academia dei Lincei de “mikroskopio” foi desenvolvido por Zacharias Janssen, por volta de 1590.

O microscópio de luz possui uma arquitetura baseada em peças essenciais formadoras da imagem (Figura 1), segundo Davidson e Abramowitz (2022): fonte de iluminação, lente objetiva e lente ocular.

O conceito de limite de resolução era “a medida de menor detalhe que se pode observar com o microscópio” (Souza, 2010, p. 11). Esse limite foi expandido pela ciência em decorrência dos avanços tecnológicos dos equipamentos de observação e também pelas técnicas e metodologias empregadas na confecção das lentes de aumento e das fontes de iluminação artificial para produzir luz branca nos microscópios, oferecendo maior nitidez na reprodução de cores da imagem (Oliveira et al., 2014).

A evolução tecnológica dos equipamentos de captura e digitalização das imagens microscópicas permitiu um considerável aumento da quantidade de pixels por imagem, derrubando o fator que limitava a perfeita fotodocumentação com “resolução” adequada. As câmeras fotográficas microscópicas

digitais são desenhadas especificamente para atender às demandas principais dos microscópios de captura de imagens de baixo contraste e alta luminosidade ou baixa luminosidade e alto contraste. Não é raro que equipamentos de pesquisa científica tenham duas câmeras digitais diferentes para fazer capturas de imagens claras e escuras com qualidade na resolução. As imagens digitais como

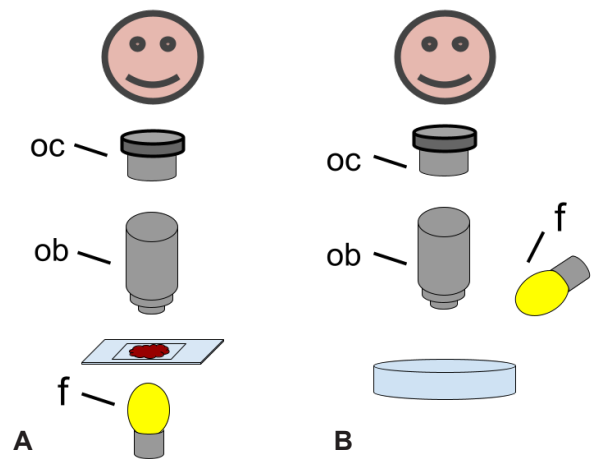


Figura 1. Esquema da arquitetura básica de equipamentos de observação microscópica com fonte de iluminação (f), lente objetiva (ob) e lente ocular (oc). (A) Microscópio de luz transmitida. (B) Estereomicroscópio de luz incidente.

Ilustração: Rosana Falcão.

dado bruto devem ser preferencialmente salvas no formato TIFF, pois esse formato quase não possui compactação, permitindo salvá-las com quantidade de pixels ideal para processamento e gerenciamento das imagens. Os formatos de imagem que geram a compactação de pixels podem suprimir detalhes microscópicos que estavam visivelmente presentes durante a observação ocular ao vivo.

Dessa forma, será abordado o cabedal de alguns equipamentos comuns disponíveis em laboratórios de microscopia para captação de imagens científicas: um contador de colônias, um estereomicroscópio óptico de luz LED (incidente e transmitida) e um microscópio óptico de luz transmitida.

Esta Circular colabora com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 9 (ODS 9) – “Construir infraestruturas resilientes, promover a industrialização inclusiva e sustentável e fomentar inovação”, mais especificamente com a meta 9.5: “Fortalecer a pesquisa científica, melhorar as capacidades tecnológicas de setores industriais em todos os países, particularmente nos países em desenvolvimento, inclusive, até 2030, incentivando a inovação e aumentando substancialmente o número de trabalhadores de pesquisa e desenvolvimento por milhão de pessoas e os gastos público e privado em pesquisa e desenvolvimento”.

O planejamento do experimento

Um projeto de pesquisa que irá utilizar-se da fotodocumentação microscópica como dado bruto científico necessita delimitar claramente o objetivo do estudo para evitar desvios na condução das análises, desde a implantação do experimento. Um bom desenho experimental otimiza o tempo de trabalho e maximiza a obtenção de dados brutos.

“Como fazer? Com que fazer? Onde fazer? Quanto fazer? Quando fazer?” Essas informações devem ser descritas minuciosamente durante o planejamento experimental, levando-se em consideração a capacidade instalada no laboratório, desde a disponibilidade de equipamentos até pessoal treinado e capacitado para treinar.

Exatidão e precisão são duas medidas de erro observacional limitantes para garantir a qualidade em análises microscópicas.

Exatidão é a proximidade do valor real, isto é, a capacidade humana ou material de detectar a estrutura que está presente ou não está presente na lâmina. Já precisão é a reprodutibilidade, ou seja, todas as vezes que fazemos determinada tarefa, fazemos do mesmo jeito (Medeiros Junior, 2010, p. 4).

Fique atento para o uso da microscopia em estudos científicos

- a) A finalidade da fotodocumentação microscópica deve fazer parte do planejamento do experimento e, nele, deve ser definido se o uso da ferramenta microscópica é para identificação/descrição morfológica, diagnóstico de presença/ausência ou para contagem de células, pois para cada finalidade existe um porta-amostra específico e um método de luz mais indicado.
- b) Devem ser buscadas na literatura científica fotos com descritores morfológicos do material analisado, seja ele uma espécie, um gênero ou uma família de microrganismo ou mesmo uma organela ou estrutura celular, de forma a estabelecer um “banco de imagens mentais” para posterior comparação com as imagens vistas ao microscópio no momento da observação.
- c) A constatação de “evento raro” requer a observação de várias amostras para compor um número estatístico significativo de repetição amostral observada; ou a repetição da preparação de lâminas da mesma amostra para comprovar a “raridade do evento”.
- d) O número de repetições biológicas, bem como as técnicas que serão utilizadas nos experimentos, devem ter critérios estatísticos já estabelecidos na fase do planejamento. Isso deve ocorrer porque o procedimento científico busca minimizar o erro para alcançar um resultado o mais próximo do real possível, mantendo a acurácia e a representatividade dos resultados obtidos.
- e) A análise microscópica quantitativa é norteadada por padrões claramente estabelecidos por técnicas de contagem utilizando câmaras apropriadas que conferem precisão a, por exemplo, métodos citométricos. Isso ocorre também na identificação dos eventos a serem contados, o que requer treinamento e conhecimento das variações morfológicas possíveis de ocorrer no material analisado, conferindo exatidão à análise.
- f) Para a análise microscópica qualitativa, as variáveis de exatidão e precisão são dependentes do fator humano, pois o treinamento no equipamento e a capacidade de identificar o evento são fatores limitantes.
- g) Ao se estabelecer uma padronização da técnica em microscopia, busca-se garantir que os resultados obtidos representem, com qualidade e precisão, os eventos esperados no processo de

pesquisa, reduzindo os equívocos nas análises. A qualidade dos resultados depende de equipamentos e de fatores materiais e amostrais, mas principalmente de fatores humanos de execução das rotinas e conhecimento técnico sobre o material a ser observado.

Escolha o porta-amostras adequado

a) A câmara de contagem ou câmara de Neubauer, também conhecida como hemocitômetro¹. Trata-se de uma lâmina padronizada com 30 mm de largura, 70 mm de comprimento e 4 mm de espessura. Apresenta uma depressão central margeada por duas áreas independentes marcadas com linhas perpendiculares, formando uma malha de 3 mm por 3 mm com quadrantes simétricos e que deve ser usada com lamínula própria cuja altura de 0,1 mm confere a cada malha o volume total de 0,9 mm³. Finalidade: contagem de partículas, células ou microrganismos. Material: amostra em suspensão. Usualmente células muito pequenas são contadas no quadrante “C”, as de tamanho intermediário no quadrante “B”, enquanto células grandes são contadas no quadrante “A” (Figura 2). Deve-se utilizar a fórmula de contagem mais apropriada para o tamanho da partícula. Método adequado para microscopia de luz.

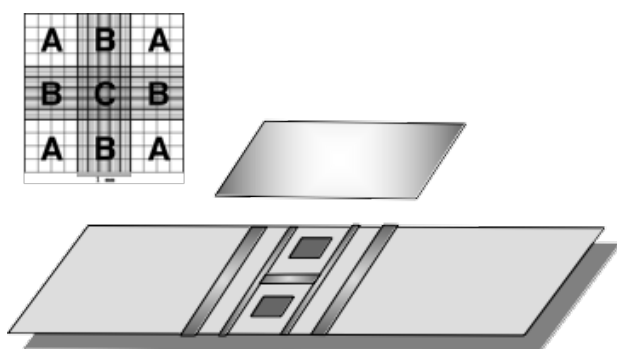


Figura 2. Desenho esquemático da câmara de Neubauer, evidenciando a malha onde cada quadrante mede 1mm por 1 mm. (A) Quadrante possui 25 espaços com volume igual a 0,25 x 0,25 x 0,1 mm cada. (B) Quadrante possui 125 espaços de 0,25 x 0,05 x 0,1 mm volume cada. (C) Quadrante central possui 625 espaços medindo 0,05 x 0,05 x 0,1 mm cada.

Ilustração: Rosana Falcão.

- b) Lâmina escavada (Figura 3A) é uma lâmina de vidro medindo 25,4 por 76,2 mm de tamanho e entre 1,2 e 2,0 mm de espessura, contendo uma, duas ou três cavidades regulares padronizadas de 0,6 a 0,8 mm de profundidade. Ela permite análise de amostras e materiais com maiores diâmetros ou volumes sem serem deformados ou amassados pela lamínula. Adequada para uso no microscópio de luz.
- c) Lâmina para imunofluorescência (Figura 3B) é uma lâmina de vidro com 1,0–1,2 mm de espessura, contendo marcações que delimitam áreas específicas dela para colocação da amostra, facilitando a automação. A marcação hidrofóbica, em epóxi ou teflon, confere relevo à área marcada, facilitando a separação de amostras em solução. Adequada para uso no microscópio de luz.
- d) Lâmina de Raj e Herr (Figura 3C) é uma lâmina de vidro medindo 25,4 por 76,2 mm de tamanho e espessura entre 1,0 e 1,2 mm, com duas lamínulas laterais (espaçadores) formando uma estrutura de suporte para lamínula de observação, que permite colocar a amostra por capilaridade no centro da lâmina. Isso evita esmagar e deformar a amostra analisada (Raj; Herr, 1970). Essa lâmina pode ser montada pelo próprio usuário com o espaçamento necessário para melhor comportar a amostra a ser analisada. Adequada para uso no microscópio de luz.
- e) Lâmina silanizada (Figura 3D) é uma lâmina de vidro com tamanho 25,4 por 76,2 mm, e entre 1,0 e 1,2 mm de espessura recoberta com silano, que garante a aderência de secções histológicas resinadas ou congeladas. Do mesmo modo, a lâmina “immunoslides” (tipo silanizada), fabricada com carga positiva, atrai eletrostaticamente as secções e também promove a aderência. Adequada para uso no microscópio de luz.
- f) Lâmina de microscopia simples é uma lâmina de vidro medindo 25,4 por 76,2 mm de tamanho e com espessura entre 1,0 e 1,2 mm, podendo ter a borda fosca, que permite a marcação com grafite, ou a borda lisa, permitindo colar etiquetas e marcar com caneta risca vidro. É usada para montagem rápida e em preparações temporárias. Adequada para uso no microscópio de luz.
- g) Placa de Petri² é um recipiente de vidro ou poliestireno transparente, constituído de duas partes: uma base e uma tampa de formato cilíndrico

¹ Idealizada pelo hematologista alemão Ernst Neubauer em 1879.

² Invenção do bacteriologista Julius R. Petri, usualmente empregada em processos em microbiologia.

achatado. Apesar de possuir diâmetro e altura variados, utiliza-se rotineiramente o tamanho 90 mm por 15 mm (Figura 4A), sem divisões internas. Existem ainda modelos específicos como a tipo Rodac (Replicate Organism Detection And Counting) de 60 mm por 15 mm (Figura 4B). Adequada para uso em estereomicroscópio, contador de colônias e microscópio de luz invertido.

- h) Placa de cultura de células é uma placa de vidro ou polipropileno dividida em poços com diâmetros diversos e que possui tampa. Adequada para uso em estereomicroscópio e/ou contador de colônias (Figura 4C).

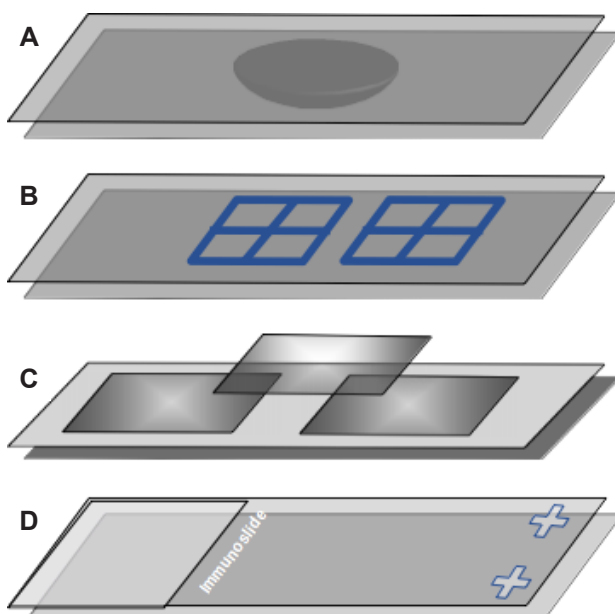


Figura 3. Desenho esquemático de porta-amostras usados em análises microscópicas. (A) Lâmina escavada com uma cavidade central. (B) Lâmina com áreas delimitadas. (C) Lâmina preparada com suportes para aumentar o espaço entre lâmina e lamínula. (D) Lâmina com carga positiva.

Ilustração: Rosana Falcão.

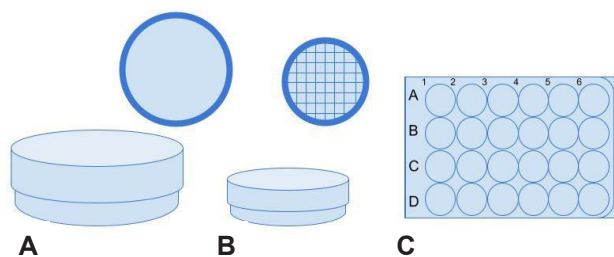


Figura 4. Desenho esquemático de porta-amostras usados em análises microscópicas e estereomicroscópicas. (A) Placa de Petri. (B) Placa tipo Rodac. (C) Placa de cultura de 12 poços.

Ilustração: Rosana Falcão.

- i) Placas de identificação de microrganismos são testes rápidos de rotina para detecção de microrganismos. Esses sistemas contêm meio de cultura desidratado e pré-esterilizado adicionado de corante, indicadores ou antibiótico diferencial que promovem o diagnóstico rápido para microbiologia com maior eficiência. As placas estão prontas para uso e aceitam amostras coletadas por pipeta, swab, raspagem, papel de filtro, alça de inoculação e estilete, e também por inoculação direta. São exemplos dessas placas: MC-Media Pad Coliforms (CC) (Sanita-Kun), que contém um indicador de atividade de β -glucuronidase (colônias azul/azul-esverdeada) (Figura 5A); Petrifilm Rapid (REC) E. coli/Coliform Count (Figura 5B) e Compact Dry E. coli/Coliform (Figura 5C), em que ambos contêm um indicador de atividade de β -glucuronidase (colônias azul/azul-esverdeada) e um indicador de tetrazólio (colônias vermelhas). São adequadas a estereomicroscópio e contador de colônias.

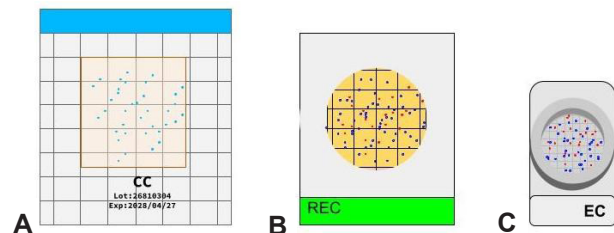


Figura 5. Placas de identificação de microrganismos para diagnóstico rápido. (A) MC-Media Pad Coliforms (Sanita-Kun). (B) Petrifilm E.coli/Coliform Count. (C) Compact Dry E.coli/Coliform.

Ilustração: Rosana Falcão.

Escolha o equipamento que melhor atende a pesquisa

O contador de colônias – tipos e métodos de iluminação da amostra

O modelo de contador de colônias (Scan 1200–Automatic Colony Counter, InterScience) possui iluminação incidente do tipo circular em LED, na parte superior, e iluminação transmitida, na parte inferior, com controles independentes de ligar/desligar e opção de combinar o fundo da placa branco ou escuro (Figura 6). Dessa forma, é possível fotodocumentar uma placa de Petri de 90 mm inteira no mesmo plano de foco e com padrão de cor para posterior comparação.

	Luzes superiores, luzes inferiores, fundo branco
	Luzes superiores, fundo branco
	Luzes inferiores, fundo branco
	Luzes superiores, luzes inferiores, fundo escuro
	Luzes superiores, fundo escuro
	Luzes inferiores, fundo escuro

Figura 6. Combinações de luzes e fundos possíveis, utilizando o contador de colônias modelo Scan 1200–Automatic Colony Counter, InterScience. Manual Scan 300/Scan 500/Scan 1200, InterScience.

Fonte: Zeiss (2024).

A combinação dessas opções produz efeitos de contraste de sombra e luz, bem como aumento ou diminuição da fidelidade da cor, por isso, é necessário testar para identificar os parâmetros que melhor representam fielmente o material analisado (Figura 7). O software Scan disponibiliza um conjunto de parâmetros-padrão para a maioria dos meios de crescimento recomendados: plate-count-agar (PCA), com padrão utilizando fundo escuro, e outro para PCA utilizando fundo branco. A utilização de fundo branco e luz superior é recomendada para identificação de cor ou tonalidades da mesma cor.

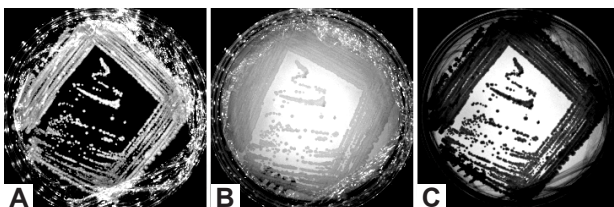


Figura 7. Cultura da levedura *Moesziomyces* sp. (BRM 063174) formando colônias de coloração branca cultivada em meio sólido potato-dextrose-agar (PDA) em placa de Petri descartável. Imagens capturadas sob diferentes combinações dos parâmetros utilizados no contador de colônias Scan 1200, da InterScience. (A) Iluminação superior e fundo preto. (B) Iluminação superior+inferior e fundo branco. (C) Iluminação inferior e fundo branco.

Fotos: Paula Fernandes Franco.

Estereomicroscópio (lupa) - tipos e métodos de iluminação da amostra

O tipo de iluminação disponível na lupa está diretamente relacionado com a aplicação com maior frequência de uso no laboratório de trabalho. Normalmente, os equipamentos destinados à fotodocumentação são dotados de sistema de iluminação com luz branca e fria. O tipo de iluminação (luz incidente ou luz transmitida) e o tipo de direcionamento (ângulo de incidência) da luz usada são importantes para modificar o contraste e melhorar a resolução da imagem (Figura 8).

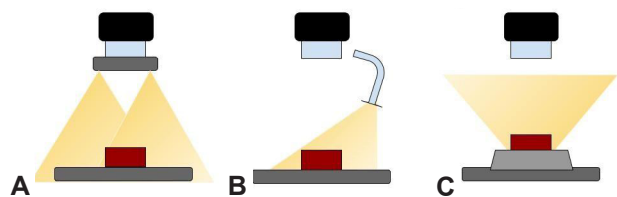


Figura 8. Esquema da direção de iluminação de lâmpada LED para estereomicroscópio. (A) Iluminação superior incidente perpendicular tipo ring light. (B) Iluminação superior incidente tipo spot simples, ângulo 45°. (C) Iluminação inferior transmitida, ângulo 90°.

Ilustração: Rosana Falcão.

a) Iluminação por luz incidente tipo ring light (Figura 8A) - É geralmente de LED branco, com diferentes intensidades, e podem ser adicionados diferentes acessórios para aplicações específicas. Pode-se ajustar a quantidade de luzes ligadas/desligadas em várias direções (Figura 9) para simular ângulos de incidência, produzindo efeitos de luz e sombra sobre a imagem, como exemplificado na Figura 10.

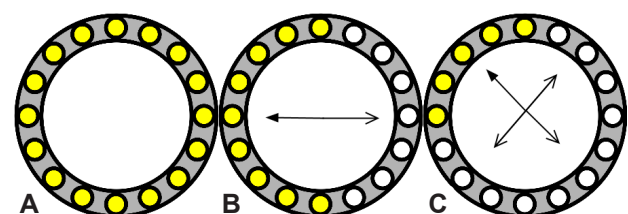


Figura 9. Esquema de iluminação superior incidente, tipo ring light, proporciona variações na intensidade e na quantidade de LEDs ligados (pontos amarelos). (A) LEDs totalmente ligados. (B) LEDs 1/2 à direita ligados (seta cabeça cheia). (C) LEDs 1/4 superior esquerdo ligados (seta cabeça cheia).

Ilustração: Rosana Falcão.

- b) Iluminação por luz incidente tipo spotlight (Figura 8B) - Trata-se de luz LED branca ou alógena com ângulo de iluminação ajustável. Requer ajustes finos no ângulo de incidência da iluminação durante a observação para a produção de luz e sombra na imagem.
- c) Luz transmitida ou back-light (Figura 8C) - Luz alógena, LED ou incandescente, produzindo método de campo claro. O espelho deslizante, quando presente, permite escolher entre os métodos de campo claro, campo escuro e contraste por iluminação oblíqua. Preferencialmente, deve-se optar por equipamentos contendo lâmpadas frias.

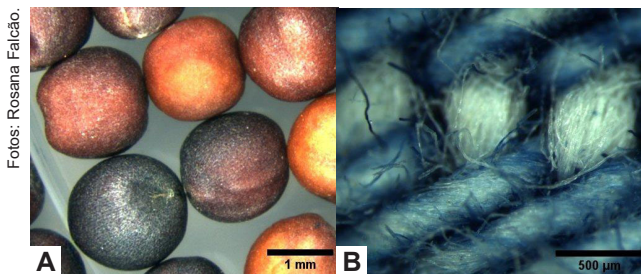


Figura 10. Fotografias evidenciando diferentes formas de incidência do ângulo da luz do ring light. A) Semente de canola iluminada com ring light total incidente. B) Detalhe do tecido denim iluminado com ring light 1/4 superior à direita.

Lentes acessórias

- a) Polarizador ou lente polarizadora – Lente que seleciona e direciona certas ondas de luz ou vibrações que passam por ela. Isso determina a quantidade e a direção da luz que ilumina uma amostra e fará parte da imagem final. Essa lente vem na fonte de iluminação com adaptação específica (ajustável/roscável) e deve ser usada concomitantemente com a lente analisadora (normalmente inserida no corpo do equipamento). Ideal para estruturas birrefringentes que aparecerão brilhantes.

Microscópio de luz transmitida - tipos e métodos de iluminação da amostra

- a) Campo claro – Método de iluminação usado para observar estruturas dotadas de cor, em que a finalidade principal é identificar a estrutura com coloração própria ou corada na preparação de amostra. Usualmente, não requer nenhum

componente específico no microscópio, porém o fechamento (afastamento da condensadora) do diafragma da iluminação pode gerar contraste, como exemplificado na Figura 11A. Algumas técnicas de coloração mais usadas em microscopia estão descritas no final desta Circular, bem como a montagem rápida de lâminas simples de microscopia.

- b) Campo escuro – Método de iluminação usado para observar estruturas que espalham a luz, em que se observam as bordas, isto é, contornos brilhantes ou estruturas densas como cristais, flagelos e cílios, como exemplificado na Figura 11B. Usualmente, requer uma lente condensadora específica embarcada no microscópio.
- c) Contraste de fase – Método de luz usado para observar estruturas transparentes à luz (defasantes) ou células isoladas em cultura. Tem como característica do método a coloração acinzentada e a formação de um halo claro envolvendo a estrutura observada, como exemplificado na Figura 11c. Esse método de análise é útil para a observação de amostras incolores, sem absorção da luz. Tem limitação quando necessita fazer a identificação de cores ou contagem diferencial de cores fracas. Requer condensadora contendo até três lentes com anel de fase e objetivas próprias combinadas. Usualmente, requer uma lente condensadora e uma objetiva específica embarcada no microscópio.

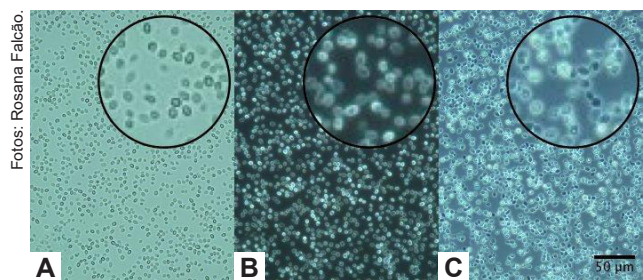
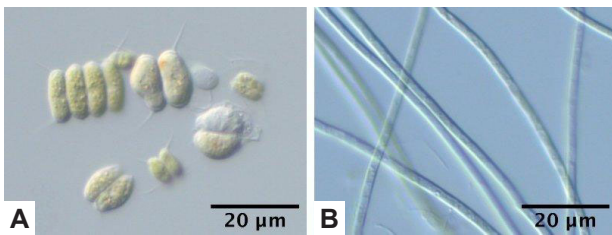


Figura 11. Imagens obtidas da mesma lâmina montada com a levedura *Moesziomyces* sp. (BRM 063174) e observada em microscópio óptico com objetiva 40x Ph2 associada a lente condensadora específica. O aspecto geral do agrupamento das células foi fotografado sob diferentes contrastes: (A) - método de campo claro; (B) - método de campo escuro; (C) - método de contraste de fase. Barra = 50 µm.

- d) Contraste de interferência diferencial (DIC) – Método de iluminação usado para observar objetos diáfanos, clarificados ou defasantes,

emprestando ao objeto observado contornos tridimensionais, como exemplificado na Figura 12, limitados ao plano de foco observado (Leal, 2000, p. 38). É conhecido também como contraste de interferência de Nomarski (NIC). Usualmente, requer um conjunto de lentes específicas embarcadas na condensadora, uma objetiva, um prisma polarizador (exemplo: prisma de Wollaston) e uma lente analisadora específica embarcada no microscópio.



Fotos: Rosana Falcão.

Figura 12. Imagens obtidas de microalgas com o método de DIC em microscópio óptico objetiva 40x para evidenciar características morfológicas individuais isoladamente de uma ou várias células no mesmo plano focal para auxiliar a classificação taxonômica. A - *Scenedesmus armatus* (BRM 064843); B - *Limnothrix* sp. (BRM 064844). Barra = 20 µm.

Conheça os componentes necessários para realizar os diferentes métodos de iluminação no microscópio de luz

- O caminho básico da luz no microscópio se inicia na fonte de iluminação; em seguida, passa por uma lente condensadora, atravessa a amostra, é capturada pela lente objetiva e projetada pela lente ocular (Teles et al., 2017). Somente depois é redirecionada e capturada pela câmera digital ou pelos olhos do observador.
- Cada método de iluminação visa conferir melhor resolução e melhor contraste ao material examinado.
- Os componentes ópticos que constroem a imagem microscópica precisam ser combinados entre si para produzir o efeito de contraste e brilho desejado na imagem observada (ZEISS, 2024).

Fonte de iluminação

- A luz usada para observação e busca microscópica pode ser bem mais amarelada, próxima de 2.700 Kelvin (K), pois é uma temperatura de cor mais confortável aos olhos para longas horas de observação.
- A luz usada para fotodocumentação microscópica precisa ser igual à luz do dia (luz do sol), que tem uma temperatura de cor entre 5.400 K e 5.900 K, para possibilitar que a câmera digital interprete corretamente as cores originais da amostra analisada.
- Existem alguns tipos de luz que precisam de ajustes, por exemplo, balanço de branco, para propiciar esse efeito. Recomendamos a leitura do manual do equipamento.
- A lâmpada alógena na posição de transmissão (luz por baixo) é comum nos microscópios com temperatura de cor amarelada (3.200 K).
- Para converter a luz amarelada para luz branca, é preciso usar a intensidade máxima de brilho da luz e o filtro azul tipo 80A, para converter de 3.200 K para 5.500 K³. LED branco: transmitida (luz por baixo) na intensidade máxima de brilho, podendo chegar a 6.400 K. Requer o uso de filtros atenuadores para ajustar o tempo de exposição na câmera digital.

Lente condensadora

Essa lente combinada com a lente objetiva produz o efeito de contraste e resolução necessários para identificação dos detalhes. Deve possuir o número de abertura compatível com o número de abertura das objetivas, pois tem a função de selecionar e conduzir a luz pelo caminho óptico do equipamento.

Normalmente, é composta por um carrossel de lentes com anel externo seletor (Figura 13A), com as abreviaturas para serem combinadas com as objetivas ou os prismas.

- 1 – para combinar com objetiva de contraste de fase Ph1.
- 2 – para combinar com objetiva de contraste de fase Ph2.
- 3 – para combinar com objetiva de contraste de fase Ph3.
- I – para combinar com objetiva com prisma DIC I.

³ Se a iluminação saturar, é necessário usar os filtros atenuadores, mas não diminuir a temperatura da luz.

- II – para combinar com objetiva com prisma DIC II.
- III – para combinar com objetiva com prisma DIC III.
- H – campo claro para combinar com todas objetivas.
- D – campo escuro para combinar com objetivas com número de abertura numérica menor que 0.99.

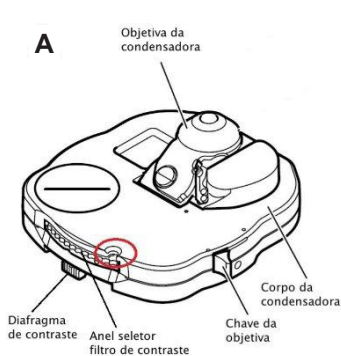


Figura 13. Componentes do sistema óptico do microscópio que influem diretamente na definição da imagem. (A) Lente condensadora evidenciando (círculo vermelho) o visor do anel seletor onde identificamos o filtro de contraste escolhido para o caminho óptico. (B) Lente objetiva evidenciando no corpo as informações: a marca Zeiss, o tipo de lente “ACHROPLAN”, o aumento 10x, a abertura numérica 0,25 e o código do fabricante.

Fonte: Zeiss, 2005. (p. 26).

Lente objetiva

Os principais fabricantes de microscópios gravam informações no corpo das objetivas para facilitar a identificação dos métodos de iluminação possíveis de executar no equipamento utilizado (Figura 13B). As abreviaturas mais comuns são:

- Ph – objetiva apropriada para realizar o contraste de fase.
- DIC – objetiva preparada para realizar o contraste de interferência diferencial⁴.
- LD – objetiva preparada para longa distância de trabalho (plano focal).
- Oil – objetiva preparada para ser usada obrigatoriamente com lamínula e óleo de imersão entre elas.

Lentes acessórias

- **Prisma de Wollaston** (Figura 14) - produz uma interferência diferencial na luz polarizada que será “traduzida” pela lente analisadora do microscópio. **DIC** – esse tipo de contraste utiliza o, que
- **Zoom/Optovar** – lente intermediária de aumento (1,5x) da imagem para a saída das oculares ou câmera digital.



Figura 14. Imagem do prisma de Wollaston para DIC utilizado no microscópio da marca Zeiss, evidenciando a especificidade do prisma onde está grafada a indicação para o tipo de objetiva (Plan-Neofluar e Planapo), o aumento (10x, 20x e 63x), o número da abertura respectivamente (0,30; 0,50 e 1,40) e a combinação com condensadoras DIC II e DIC III.

Lentes oculares

- O conjunto de lentes denominadas oculares estão inseridas no tubo ocular cuja função é produzir aumento fixo do campo de visão e pode propiciar a compensação de astigmatismo para cada olho individualmente, bem como propicia o ajuste ergonômico da distância interpupilar (Figura 15).
- Usualmente, as lentes oculares são formadas por um par de lentes fixas (sem ajustes) ou um par misto de lentes com diafragma de ajuste da dioptria e outro sem esse diafragma.
- Acessórios, como retículos de medição no formato de régua, quadriculado ou foco central, podem estar presentes em apenas uma das oculares, mas não irão aparecer nas fotos.
- DICA: primeiro, deve-se ajustar o foco da imagem para câmera digital na tela do computador. Em seguida, ajustar o foco das oculares com diafragma de ajuste da dioptria. Assim, a observação ocular servirá também para conferir a veracidade das cores antes da captura da imagem digital.

⁴ Associado com o prisma de Wollaston.

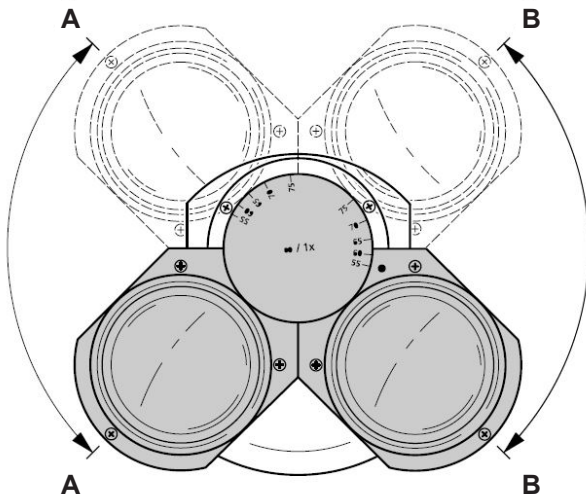


Figura 15. Imagem dos tubos oculares utilizadas no microscópio da marca Zeiss, evidenciando o ajuste ergonômico da distância interpupilar.

Fonte: Zeiss, 2005.

Técnica de microscopia em preparações temporárias para cortes frescos a mão livre ou suspensão de microrganismos

Para a observação microscópica de microrganismos ou células no seu meio de cultura natural, pode-se fazer a montagem temporária de lâminas sem o uso de corantes ou fixadores e observar esse material ao microscópio em métodos de luz contrastantes ou defasantes para não produzir modificações na estrutura do organismo, na cor, na transparência ou na turgidez.

Técnicas de coloração de estruturas específicas ou simplesmente coloração contrastante são utilizadas para observar as amostras ao microscópio de luz em método de campo claro que confirmar a fidelidade da cor.

Montagem rápida de lâmina e lamínula para uso em microscópio

- 1) Limpar a lâmina e a lamínula com etanol 70% e secar com lenço de papel absorvente e muito suave (tipo lenço de nariz) para não arranhar.
- 2) Colocar uma gota da amostra sobre a lâmina limpa ou cortes finos de material fresco ou levemente fixados.

- 3) Opcionalmente, colocar uma gota de glicerol 50%, e com a ponteira homogeneizar a mistura (evitar formar bolhas).
- 4) Colocar uma lateral da lamínula encostada na lâmina, segurando a outra com agulha ou pinça (Figura 16A).
- 5) Encostar na gota e descer lentamente, arrastando a lamínula para espalhar e evitar a formação de bolhas.
- 6) Antes de colocar no microscópio para observar, deve-se retirar o excesso de líquido, colocando uma ponta de papel-filtro do lado da lamínula (Figura 16B).
- 7) Opcionalmente, usar esmalte nas quatro laterais da lamínula para evitar o escorregamento da lamínula ou o extravasamento do líquido sob a lamínula, e aguardar o completo endurecimento para observar.

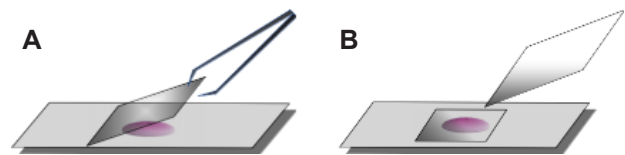


Figura 16. Esquema ilustrativo da montagem da lâmina de microscopia simples.

Ilustração: Rosana Falcão.

Colorações rápidas em material fresco para observar ao microscópio óptico.

- Cortes finos de material vegetal: colocar em uma placa contendo água.
- Suspensão de microrganismos: homogeneizar ou ressuspender.

a) Lugol (protocolo para colorir amido)

- 1) Colocar o material sobre a lâmina previamente limpa.
- 2) Adicionar uma gota do reagente (corante).
- 3) Cobrir com lamínula e aguardar de 1 a 5 minutos.
- 4) Pingar uma gota de água ou glicerol 50% na borda da lamínula e retirar excesso do reagente com papel filtro na borda contrária.
- 5) Observar em estereomicroscópio e/ou microscópio com luz branca e sob campo claro para identificação da cor.

- 6) O uso do Lugol para identificar amido resulta nas colorações azul-negro, azul-roxa ou marrom-escuro.

b) Lugol (protocolo para colorir celulose)

- 1) Colocar o material sobre a lâmina previamente limpa.
- 2) Adicionar uma gota do reagente (corante) e aguardar de 1 a 5 minutos.
- 3) Pingar uma gota de solução de ácido sulfúrico 70% sobre o material e cobrir com lamínula (usar fluxo de exaustão).
- 4) Apertar a lamínula e retirar excesso do reagente com papel filtro em todas as bordas (preferencialmente, vedar a lamínula).
- 5) Observar em estereomicroscópio e/ou microscópio com luz branca e sob campo claro para identificação da cor usando óculos de proteção e máscara.

O uso de Lugol para identificar parede de celulose resulta em coloração azul-brilhante e também em inchaço das paredes.

A Tabela 1 mostra componente, quantidade e concentração de materiais para preparo da coloração.

Tabela 1. Solução de Lugol (aquoso).

Componente	Quantidade	Concentração final
Iodo (I ₂) CAS 7553-56-2	0,3 g	0,3%
Iodeto de potássio (KI) P.A ⁽¹⁾ . CAS 7681-11-0	1,5 g	1,5%
Água	100 mL	--

Preparo: usar fluxo de exaustão para dissolver o iodeto de potássio na água. Depois, acrescentar o iodo sob agitação até dissolver completamente. Deixar descansar algumas horas. Filtrar em lã de vidro e guardar em frasco âmbar.

⁽¹⁾ Grau analítico do reagente químico: PA significa "puro para análise".

Fonte: Johansen (1940).

c) Cloreto férrico (protocolo para colorir compostos fenólicos)

- 1) Colocar o material sobre a lâmina previamente limpa.

- 2) Adicionar uma gota do reagente (corante).
- 3) Cobrir com lamínula e aguardar de 1 a 2 minutos.
- 4) Pingar uma gota de água ou glicerol 50% na borda da lamínula e retirar excesso do reagente com papel filtro na borda contrária.
- 5) Observar em estereomicroscópio e/ou microscópio com luz branca e sob campo claro para identificação da cor.

O uso de cloreto férrico para identificação de compostos fenólicos (inclusive taninos) resulta nas colorações em tons de negro-azulada ou verde escuro.

A Tabela 2, a seguir, mostra componente, quantidade e concentração de materiais para preparo da coloração.

Tabela 2. Solução de cloreto férrico 10% (aquoso).

Componente	Quantidade	Concentração final (%)
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃) CAS 497-19-8	0,3 g	0,3%
Cloreto férrico hexa-hidratado (FeCl ₃ · 6H ₂ O) CAS 10025-77-1	10 g	10%
Água	100 mL	--

Preparo: usar fluxo de exaustão para dissolver o cloreto férrico na água. Depois, acrescentar o carbonato de sódio sob agitação até dissolver completamente.

Fonte: Johansen (1940).

d) Carmim acético – ferroso (protocolo para colorir núcleo da célula)

- 1) Colocar o material sobre a lâmina previamente limpa.
- 2) Adicionar uma gota do reagente (corante).
- 3) Cobrir com lamínula e aguardar de 1 a 5 minutos (ou 30 minutos para material denso).
- 4) Pingar uma gota de água ou glicerol 50% na borda da lamínula e retirar excesso do reagente com papel filtro na borda contrária.
- 5) Observar em estereomicroscópio e/ou microscópio com luz branca e sob campo claro para identificação da cor.

O uso de carmim acético para identificação de ácidos nucleicos resulta na coloração na tonalidade de rosa escuro até roxo.

A Tabela 3 mostra componente, quantidade e concentração de materiais para preparo da coloração.

Tabela 3. Solução de carmim acético 0,5% ferroso.

Componente	Quantidade	Concentração final
Carmim CAS 1390-65-4	1 g	0,5%
Ácido acético (CH ₃ CO ₂ H) CAS 64-19-7	90 mL	45%
Água	110 mL	--
Acetato de ferro (II) aquoso saturado (Fe(CO ₂ CH ₃) ₂) CAS 3094-87-9	poucas gotas	--

Preparo: usar fluxo de exaustão para misturar o ácido acético na água. Aquecer até ferver, desligar e adicionar o carmim sob agitação até dissolver completamente. Esfriar em caixa de gelo e adicionar gotas de acetato de ferro até apresentar a cor "dark red".

Fonte: Johansen (1940).

e) Azul de anilina em ácido láctico (protocolo para colorir fungos)

- 1) Colocar uma gota do corante no centro de uma lâmina de microscopia limpa.
- 2) Remover um fragmento da colônia fúngica com alça em "L" estéril e colocá-lo sobre o corante.
- 3) Misturar delicadamente com a alça e cobrir com lamínula.
- 4) Para a visualização dos fungos em microcultivos, remover o bloco de ágar e colocá-lo sobre uma lâmina. Colocar, por cima, uma gota do corante e cobrir com uma lamínula limpa.
- 5) Observar as estruturas fúngicas ao microscópio. O uso do azul de anilina (algodão) para identificação de fungos resulta em coloração azul diferencial para elementos da parede celular dos fungos, principalmente quitina e celulose.

As Tabelas 4 e 5, a seguir, mostram componentes, quantidades e concentrações de materiais para preparo da coloração.

Tabela 4. Solução estoque de azul de algodão em ácido láctico.

Componente	Quantidade	Concentração final
Azul de metila/algodão (CAS 28983-56-4 e C.I. 42780) ou Azul de anilina (CAS 62-53-3) ou Azul de tripano (CAS 72-57-1 e C.I. 23850)	1 g	1%
Ácido láctico ACS 85% CAS 50-21-5	99 mL	85%

Preparo: usar fluxo de exaustão para medir ácido láctico. Depois, acrescentar o corante e misturar por 5 minutos sob agitação. Dar preferência a frascos escuros. Guardar em temperatura ambiente.

Fonte: Li (2013).

Tabela 5. Solução de uso de azul de algodão 0,01% em ácido láctico modificada.

Componente	Quantidade	Concentração final
Solução estoque de azul de algodão em ácido láctico	4 mL	0,01%
Ácido láctico ACS 85% CAS 50-21-5	96 mL	21,25%
Glicerol (ou glicerina) CAS 56-81-5	250 mL	62,5%
Água	50 mL	--

Preparo: usar fluxo de exaustão para dissolver ácido láctico, glicerina e H₂O. Depois, acrescentar a solução estoque. Dar preferência a frascos escuros. Guardar em temperatura ambiente.

Fonte: Li (2013).

Referências

DAVIDSON, M. W.; ABRAMOWITZ, M. Optical microscopy. In: HORNAK, J. P. (ed.). **Encyclopedia of imaging science and technology**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471443395.img074>.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. London: McGraw-Hill Publishing Company, 1940.

LEAL, L. H. M. **Fundamentos de microscopia**. Rio de Janeiro: EdUERJ, 2000. 128 p.

LI, D.-W. Microscopic methods for analytical studies of fungi. In: GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G.; AYYACHAMY, M.; TURNER, K. M.; O'DONOVAN, A. (ed.). **Laboratory protocols in fungal biology: current methods in fungal**

biology. New York: Springer, 2013. p. 113-131.

DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_7.

MEDEIROS JUNIOR, N. A padronização na microscopia. **Boletim Qualifique**. n. 31, p. 1-4, 2010.

OLIVEIRA, C. H. L. de; COSTA, M. A. D.; COSTA, G. H. Estudo comparativo entre fontes de iluminação com lâmpadas halógenas e com LED no diagnóstico da microscopia clínica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 29., 2014, Uberlândia. **A engenharia biomédica propulsora de desenvolvimento e inovação tecnológica em saúde: anais...** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

RAJ, B.; HERR, J. M. The isolation of protoplasts from the placental cells of *Solanum nigrum* L. **Protoplasma**, v. 69, p. 291-300, 1970.

DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01320295>.

SOUZA, W. D. (ed.). **Microscopia óptica: fundamentos e aplicações às ciências biomédicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2010. 220 p.

TELES, V. C.; ANDREANI, L.; VALADARES, L. F. **Uso de microscopia de luz e eletrônica como técnicas de análise morfológica**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2017.

ZEISS, C. **Enhancing contrast in optical microscopy**. Disponível em: <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast.html>. Acesso em: 5 abr. 2024.

ZEISS, C. **Operating manual Axio Imager: Upright Microscope**. v.B 46-0078. Germany: Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2005. 158 p.

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº
Ed. Embrapa Agroenergia
Caixa Postal 40315
CEP 70770-901, Brasília, DF
www.embrapa.br/agroenergia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Juliana Evangelista da Silva Rocha*

Secretária-executiva: *Lorena Costa Garcia Calsing*

Membros: *Alexandre Nunes Cardoso, Diogo Keiji Nakai, João Ricardo Moreira de Almeida, Leonardo Fonseca Valadares, Lívia Teixeira Duarte Brandão, Priscila Seixas Sabaini e Sílvia Belém Gonçalves*

Circular Técnica 19

ISSN 2177-4420 / e-ISSN 2177-4420
Novembro, 2024

Edição executiva e revisão de texto: *Antonio Claudio da Silva Barros*

Normalização bibliográfica: *Rosângela Galon Arruda (CRB-1/2123)*

Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*

Diagramação: *Maria Goreti Braga dos Santos*

Publicação digital: PDF



Ministério da
Agricultura e Pecuária

Todos os direitos reservados à Embrapa.