

## INTRODUÇÃO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA

**Silvia Regina Galleti**

Instituto Biológico

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal

E-mail: galleti@biologico.sp.gov.br

O desenvolvimento e aperfeiçoamento da microscopia eletrônica está intimamente associado ao progresso alcançado pela Biologia, nos últimos 100 anos. O microscópio eletrônico possibilitou a observação direta de aspectos ultraestruturais das células até então desconhecidos. Como resultado dessas novas observações, nossa compreensão sobre a organização dos tecidos vegetais e animais foi enormemente ampliada, e muitas das nossas idéias a respeito da construção e função celulares foram radicalmente alteradas.

### **Tipos de Microscópios**

Cada tipo de microscópio e cada técnica de preparação de material para exame oferece vantagens específicas na demonstração de certos elementos morfológicos. Os microscópios pertencem, basicamente, a duas categorias: luminoso (ML) e eletrônico (ME). As diferenças estão na radiação utilizada e na maneira como ela é refratada.

A microscopia de luz utiliza-se da radiação de ondas luminosas, sendo esta refratada através de lentes de vidro. O campo microscópico (ou a área observada) aparece brilhantemente iluminado e os objetos estudados se apresentam mais escuros. Geralmente, os microscópios desse tipo produzem um aumento útil de, aproximadamente, 1.000 X.

Na microscopia eletrônica a radiação empregada é a de feixe de elétrons, sendo ele refratado por meio de lentes eletrônicas. O microscópio eletrônico produz aumentos úteis de 200.000 a 400.000X, sendo seu poder resolvente cerca de 100 vezes maior que o do microscópio de luz. A melhoria do poder resolvente do microscópio eletrônico está diretamente relacionada ao curto comprimento de onda apresentado pelos raios eletrônicos utilizados para ampliar o espécimen e a uma maior abertura numérica obtida em função da diminuição da distância focal. Em termos básicos, classificamos o microscópio eletrônico em dois tipos: de transmissão e de varredura.

### **Princípios da microscopia eletrônica**

#### Poder resolvente (ou poder de resolução)

Ao empregar um microscópio em um estudo, tem-se como objetivo visualizar mais detalhes do que podemos com a vista desarmada. A ampliação que as lentes

nos proporcionam é apenas um meio para chegar a esse objetivo, e não terá valor se a imagem produzida no fim não contiver mais detalhes do que podemos ver – ou resolver – sem o auxílio do microscópio. A limitação básica não é uma questão de aumento, mas de *poder resolvente*, ou seja, a capacidade de distinguir, distinta e separadamente, dois pontos adjacentes. O poder resolvente de um microscópio é função do comprimento de onda da luz utilizada e da abertura numérica, que é uma característica do sistema de lentes.

#### Comprimento de onda

Um objeto torna-se visível ao microscópio como resultado de sua interação com as ondas de luz usadas para iluminá-lo. Essa interação ocasiona um desvio das ondas quando estas passam pelo objeto. Objetos muito pequenos não ocasionarão quaisquer desvios detectáveis nas ondas e, portanto, permanecerão invisíveis (ou não resolvidos). Quanto menor o comprimento de onda da luz, menor será o objeto que poderá ocasionar desvios das ondas e, portanto, melhor será o poder resolvente do microscópio. Isto significa que a natureza da luz limita a quantidade de detalhes que pode ser resolvida em um microscópio.

#### Abertura numérica

O ângulo formado pelo eixo óptico e os raios mais externos ainda cobertos pela objetiva é a medida da abertura numérica. O valor da abertura numérica está diretamente relacionada com o índice de refração do meio por onde a radiação é projetada. Assim, o máximo de abertura numérica para a objetiva a seco é menor do que 1, e as objetivas de imersão têm uma abertura numérica ligeiramente maior, na faixa de 1,2 a 1,4. O comprimento de onda da luz utilizada nos microscópios de luz é, também, limitado; a luz visível varia entre 400 e 700 nm. O limite de resolução, isto é, o menor objeto que pode ser distintamente visualizado, é obtido com o menor comprimento de onda da luz visível e com objetiva de maior abertura numérica.

Portanto, o melhor poder resolvente conseguido com o microscópio de luz é de 0,2 mm – a abertura numérica não pode ser aumentada, e mesmo usando luz visível de comprimento de onda mínimo (cerca de 0,45 mm), o poder resolvente não melhora significativamente. A única maneira de melhorar o poder resolvente consiste em se reduzir o comprimento de

onda da radiação. Para isso, se fez necessário desenvolver equipamentos que empreguem outra forma de radiação, e é aqui que o desenvolvimento do microscópio eletrônico começa.

### **Componentes do microscópio eletrônico**

#### Propriedades ondulatórias dos elétrons

Em condições apropriadas, os elétrons apresentam propriedades ondulatórias, que, assim como a luz visível, encontram-se associados a um comprimento de onda, cujo valor é de, aproximadamente, 0,005 nm. Desta forma tem-se uma melhoria correspondente no poder resolvente. A comparação deste valor com o comprimento de onda da luz visível (0,5  $\mu$ m ou 500 nm) mostra que um feixe eletrônico é cerca de 100.000 vezes menor. Considerando apenas este fator, teríamos um aumento correspondente no poder resolvente. Porém, o poder resolvente efetivamente conseguido será discutido após considerarmos os outros componentes do microscópio eletrônico.

#### Canhão eletrônico

Canhão eletrônico é a fonte de iluminação do microscópio eletrônico e consiste de um pequeno fragmento de fio em forma de V. Uma alta voltagem é aplicada nesse filamento, fazendo com que uma corrente flua através dele e o incandesça, emitindo elétrons. A propriedade de emitir elétrons por aquecimento é comum a todos os metais e chama-se emissão termoiônica. O comprimento de onda dos elétrons está diretamente relacionado a voltagem aplicada sobre o filamento. Quanto maior for a voltagem menor será o comprimento de onda dos elétrons, favorecendo o poder resolvente.

#### Lentes eletrônicas

Um campo magnético radialmente simétrico – como aquele formado por um enrolamento de fio elétrico através do qual passa uma corrente – atuará como uma lente que pode ser usada para focalizar um feixe eletrônico. Na prática, a lente eletrônica consiste basicamente de uma bobina, formada por milhares de voltas de fio, através da qual passa uma corrente.

### **Microscópio eletrônico de transmissão**

Esse tipo de microscópio é comumente chamado de microscópio eletrônico direto ou de transmissão (MET) pelo fato da imagem do espécimen ser formada simultaneamente à passagem do feixe de luz através dele.

O emprego do MET é bastante difundido no estudo de materiais biológicos, pois ele permite definição de imagens intracelulares, permitindo estudos de morfologia celular, aspectos gerais das organelas e

também da interação de parasitas com as células, fornecendo informações sobre alterações e efeitos citopatológicos ocasionados por vírus, fitoplasmas, micoplasmas, bactérias e outros organismos diminutos, de impossível visualização na microscopia de luz.

#### Composição

A construção do MET é robusta, a fim de garantir estabilidade mecânica e evitar perturbações por vibrações do edifício. As bobinas das lentes, através das quais passam correntes, tenderiam a aquecer-se e, portanto são usualmente resfriadas por água que circula a sua volta. Isso é conseguido com uma unidade de refrigeração de água interligada ao MET.

Nossos olhos não são sensíveis a elétrons, por isso a imagem final é projetada sobre um anteparo de observação, que é recoberto com um material que fluoresce quando irradiado com elétrons, ou sobre uma placa fotográfica, se pretendemos registrar a imagem de forma permanente. Na prática, o intervalo de aumentos do MET varia de 1.000 a cerca de 200.000X.

As lentes eletrônicas, assim como as lentes de vidro, apresentam defeitos. Esses defeitos interferem no poder resolvente do microscópio eletrônico. A solução adotada para minimizar esse problema reside em se trabalhar apenas com a porção central da lente, e isso se consegue construindo nela uma abertura de pequeno diâmetro. Outro fator que impede que se atinja o poder resolvente teórico é a estabilidade mecânica do MET. Devido ao fato de se atingir um poder resolvente na ordem de nanômetros, qualquer oscilação em escala semelhante irá interferir no resultado final. Portanto, o poder resolvente obtido na prática depende essencialmente da qualidade do projeto e construção do ME, da natureza do espécimen, e ainda do cuidado e experiência do operador. Os melhores resultados obtidos para amostras biológicas situa-se na faixa de 1 nm. Comparando-se com o poder resolvente do microscópio de luz, temos uma melhoria de cerca de 200 vezes.

### **Microscópio eletrônico de varredura**

No microscópio eletrônico de varredura (MEV) um feixe de elétrons extremamente estreito é usado para varrer o espécimen – isto é, ele é movido para diante e para trás enquanto passa através do espécimen. O feixe tem vários efeitos sobre o espécimen, dos quais o principal para nossa finalidade é que ele faz com que o próprio espécimen emita elétrons. A imagem é construída em sequência, no tempo, à medida que o espécimen é varrido. Os MEV apareceram no mercado, pela primeira vez, em 1965, e desde então se têm revelado indispensáveis em muitos tipos de pesquisa biológica, contribuindo para a classificação e taxonomia de insetos e fungos, estudo da morfologia

de pólen e em pesquisas de superfícies de diversas estruturas de plantas e animais.

#### Composição

Os principais componentes do MEV assemelham-se àqueles do MET. A coluna, com o canhão eletrônico e a série de lentes eletrônicas, e o sistema de alto vácuo, são similares nos dois tipos de equipamentos. Um conjunto de bobinas defletoras faz com que o feixe varra o espécimen. Assim, a imagem é montada ponto a ponto, linha por linha, do mesmo modo que a imagem no visor de televisão. A imagem pode ser observada diretamente, ou fotografada.

O MEV tem uma série de aspectos extremamente valiosos. Ele pode ser operado em uma escala ampla de aumentos, desde 10X até 100.000X. Seu alcance assim se estende desde aquele da lupa manual até o de um MET. O MEV tem grande profundidade de foco. Como consequência, a topografia superficial de objetos sólidos pode ser examinada com grande facilidade, e as micrografias têm aspecto tridimensional. A resolução obtida com o MEV depende de uma série de fatores. O diâmetro da sonda do feixe eletrônico varrendo o espécimen é o mais importante de todos, mas a natureza do espécimen e a interação deste com o feixe também são influentes, bem como a velocidade de varredura e o número de linhas na imagem. Na prática, uma resolução de cerca de 10 nm pode ser conseguida sob condições favoráveis.

#### **MEV x MET**

O MET é um instrumento admirável para estudar os detalhes mais finos de uma estrutura celular, ou a organização molecular de vírus ou constituintes subcelulares. O preço de conseguir alta resolução, entretanto, é que o instrumento é complexo, os espécimens devem ser extremamente finos e é difícil obter informação sobre estruturas em três dimensões. O MEV, por outro lado, é ideal para estudar a topografia de superfície de objetos sólidos, mas fornece pouca, ou nenhuma informação sobre a estrutura interna. Seu poder separador não se iguala ao do microscópio de transmissão, embora seja adequado para muitos propósitos. Deve-se sempre ter em mente o objetivo da pesquisa que está desenvolvendo, pois, ele é que indicará qual equipamento deverá ser empregado para se atingir os resultados desejados.

#### BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- BOZZOLA, J.J. & RUSSELL, L.D. *Electron microscopy*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1999. 670p.
- GRIMSTONE, A.V. *O microscópio eletrônico em biologia*. São Paulo: E.P.U./EDUSP, 1980. 70p.
- MEEK, G.A. *Practical electron microscopy for biologists*. New York: John Wiley and Sons, 1976. 528p.