
Aula Prática 02: MICROSCOPIA ÓPTICA**A. Componentes do microscópio óptico**

A microscopia óptica possibilita o aumento de imagens através da luz que, após incidir sobre a amostra, passa por um conjunto de lentes objetivas (que formam e aumentam a imagem) e oculares (que aumentam a imagem).

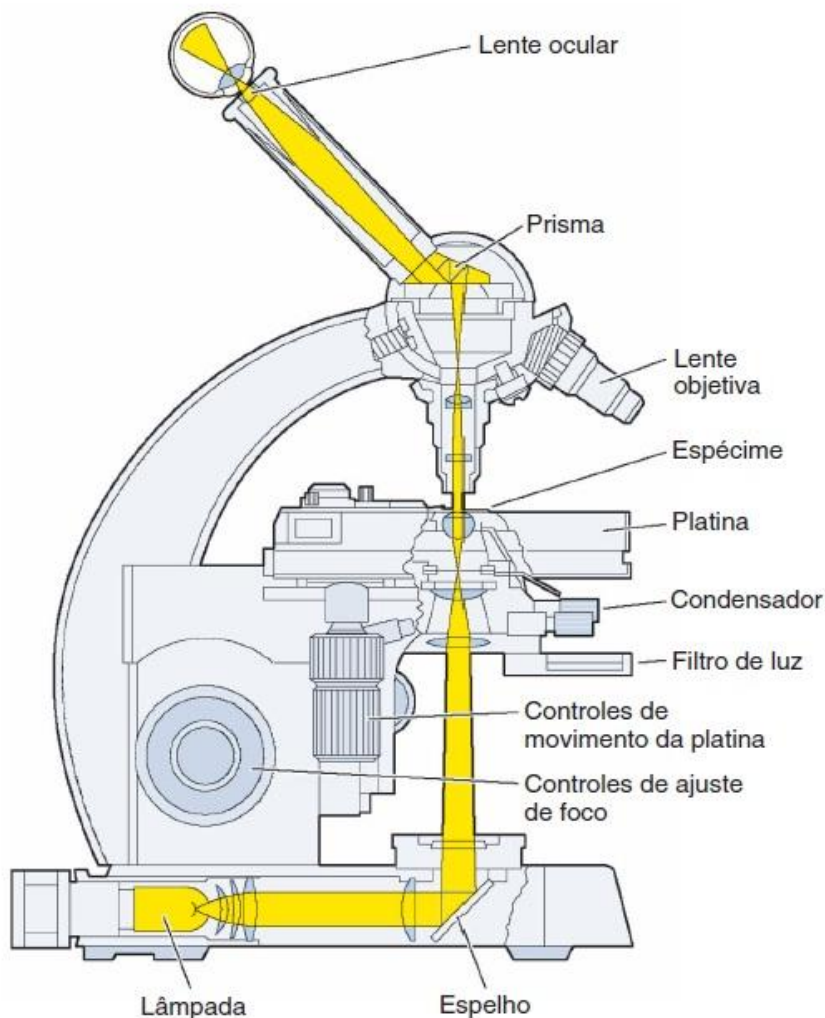
Além de ampliar a imagem de um objeto, o microscópio serve para aumentar o poder de resolução do olho humano (0,1 - 0,2 mm). Poder de resolução é a capacidade de distinguir dois pontos muito próximos um do outro. Os microscópios ópticos têm um limite de resolução da ordem de 0,2 μm , ou seja, as lentes destes microscópios conseguem mostrar dois pontos distintos se estes estiverem separados por distâncias de pelo menos 0,2 μm . É importante lembrar que, para uma estrutura ser observada através de um microscópio óptico, é necessário que ela seja suficientemente fina para deixar que os raios luminosos a atravessem, além de ter índices de refração ou coloração diferentes do meio que a circundam.

Um microscópio óptico típico é constituído por partes mecânicas, ópticas e elétricas:

- 1) **Base:** é o suporte do microscópio, peça que sustenta todas as outras.
- 2) **Braço ou estativa:** é a peça que liga a base até a parte superior do microscópio e onde se deve segurar o microscópio para ser transportado.
- 3) **Fonte de luz:** normalmente uma lâmpada ou, em modelos mais antigos, um espelho, que se apoia na base do microscópio. No caso da fonte de luz ser uma lâmpada, pode-se observar, ao lado da estativa ou da base do microscópio, o interruptor da lâmpada e o regulador da intensidade luminosa.
- 4) **Leite condensadora (Condensador):** de forma circular e situado entre a platina e a base, o condensador converge os raios luminosos provindos da lâmpada e projeta-os como um cone de luz sobre o material que está sendo examinado.
- 5) **Diafragma (Filtro de luz):** fica abaixo da lente condensadora e se liga a uma alavanca que permite sua abertura ou fechamento, levando ao controle da passagem total ou parcial da luz.
- 6) **Platina:** é uma placa de metal com um orifício no centro, por onde passam os raios luminosos. O objeto que vai ser observado é colocado sobre uma lâmina de vidro e esta, sobre a platina, exatamente em cima do orifício.
- 7) **Charriot:** Localizado acessória e superficialmente à platina, é formado por uma presilha, dois botões giratórios e dois trilhos que têm a função de movimentar a lâmina no plano e assim permitir a observação de toda a sua área.
- 8) **Lentes objetivas:** são lentes que projetam uma imagem aumentada e invertida do objeto nas oculares e inserem-se no revólver, através de rosca. Toda objetiva traz gravado o número do aumento que proporciona. A objetiva de 100X é também chamada objetiva de imersão e é somente utilizada com óleo especial, o qual permite maior refração da luz para dentro da objetiva, corrigindo a pouca luminosidade nas observações feitas em grandes aumentos. Após o uso, o óleo é removido com xilol, éter ou benzina, embebido em papel especial ou algodão.

- 9) **Revólver:** peça encontrada abaixo do canhão na qual se inserem as lentes objetivas. É dotado de um movimento de rotação que permite posicionar a objetiva desejada para a observação do material a ser analisado.
- 10) **Canhão:** parte mais superior do microscópio, contém um conjunto de espelhos que projetam a imagem em direção às oculares nele encaixadas.
- 11) **Lente ocular:** aumenta a imagem do objeto após o aumento já proporcionado pela objetiva. É através desta lente que o observador vê a imagem do objeto (daí o nome ocular, uma vez que o olho do observador está colocado à frente dela). Toda ocular traz gravado o número de aumentos que proporciona. Para saber-se em que aumento vemos um objeto ao microscópio, basta multiplicar o número do aumento dado pela objetiva pelo número do aumento dado pela ocular. Por exemplo, se a objetiva usada aumenta 5X e a ocular aumenta 10X, o objeto está sendo observado com um aumento total de 50X.
- 12) **Macrométrico e micrométrico:** na parte lateral da estativa existem 2 parafusos encaixados um no outro. O maior deles é o macrométrico, que permite grandes avanços ou recuos da platina em direção à objetiva, enquanto o micrométrico permite pequenos avanços ou recuos. Esse movimento da platina leva à focalização do material observado em diferentes aumentos.

A figura a seguir mostra o trajeto dos raios luminosos em um microscópio óptico.



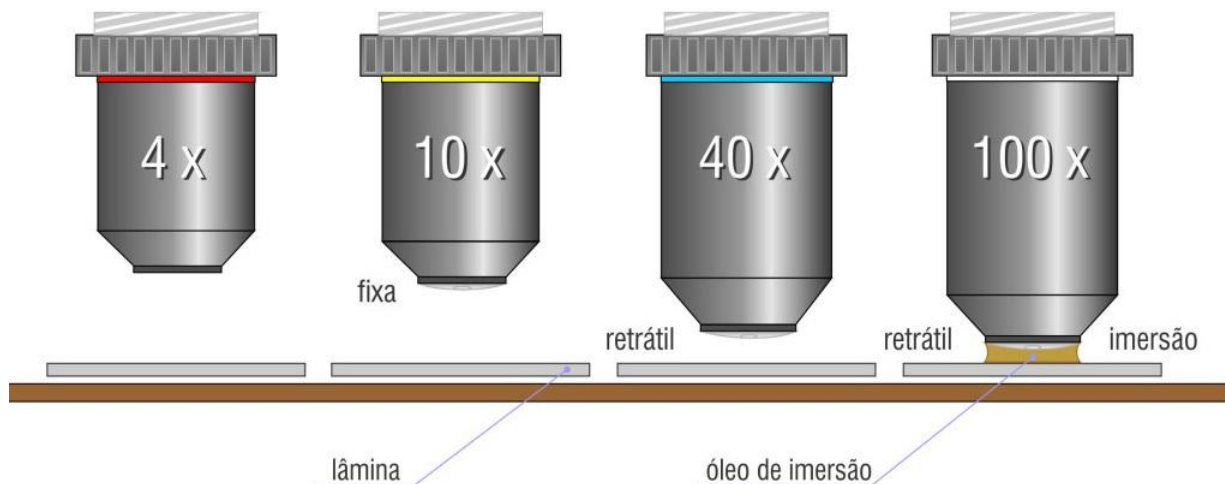
C. Procedimentos para utilização do microscópio óptico

PREPARO DA AMOSTRA

- 1) Limpe uma lâmina e uma lamínula com papel higiênico embebido em álcool 70%. Espere secar.
- 2) Coloque sobre a lâmina um pedaço de papel contendo a letra “f” na posição normal de leitura.
- 3) Cubra o papel com uma gota d’água e cubra-o com a lamínula.

OBSERVAÇÃO DA AMOSTRA

Siga as normas de uso do microscópio descritas a seguir para proceder à observação nos aumentos de 40X, 100X, 400X e 1.000X.



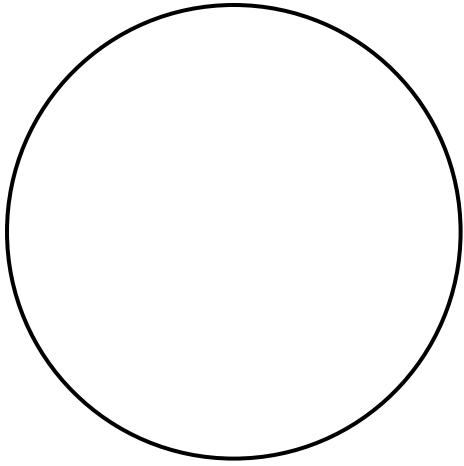
Esquematize o material em cada aumento nos círculos disponíveis na página 5. Cada círculo representa o campo de visão do microscópio, portanto, esquematize o material na mesma proporção visualizada no microscópio.

- 1) Descubra o microscópio, desenrole o cabo de força e conecte-o na voltagem correta.
- 2) Vire as lentes oculares para a posição desejada de observação. **Lembre-se de apertar o parafuso que permite a rotação do canhão após a movimentação.**
- 3) Coloque a lâmina sobre a platina (com a letra “f” na posição normal de leitura), segurando-a com uma das mãos e abrindo a presilha com a outra. Procure colocar a letra “f” o mais centralizada possível em relação ao feixe de luz.
- 4) Gire o revólver, encaixando a objetiva de menor aumento (4X ou 10X).
- 5) Acenda a luz do microscópio (acione primeiramente o interruptor e em seguida o regulador de intensidade) e centralize o material na platina utilizando o *charriot*. Faça isso olhando lateralmente, o que facilita a operação.

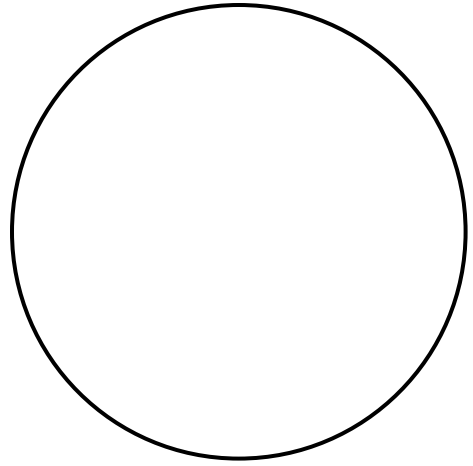
- 6) Movimentando o macrométrico, levante a platina até o ponto máximo, sem que a lâmina encoste na objetiva.
- 7) Ajuste a distância interpupilar.
- 8) Olhe através das oculares e, utilizando o macrométrico, desça lentamente a platina até que se possa visualizar o material a ser analisado.
- 9) Acerte o ponto exato do foco com o micrométrico e, caso seja necessário, proceda ao ajuste de dioptria: tape um dos olhos, focalize com o micrométrico, troque o olho tapado e ajuste o foco no anel existente (se houver) na base da ocular correspondente ao olho aberto.
- 10) Corrija a intensidade de luz e abertura do diafragma para evitar ofuscamento e permitir a percepção de profundidade de campo e o contraste desejados.
- 11) Observe o material atentamente trabalhando o foco fino com o micrométrico.
- 12) Gire o revólver para passar para a próxima objetiva de maior aumento, lembrando sempre de regular a intensidade de luz e a abertura do diafragma, bem como de corrigir a focalização com o micrométrico. **Não utilizar o macrométrico para a focalização a partir desta etapa. Somente o micrométrico.**
- 13) Realize a observação nas objetivas de 10X e 40X.
- 14) **Para utilizar a objetiva de 100X é imprescindível o uso do óleo de imersão sobre a lâmina:** gire o revólver de modo a deixar a lâmina entre as objetivas de 40X e 100X.
- 15) Encoste o conta-gotas contendo o óleo de imersão na lâmina, exatamente sobre a letra “f”. **Não é necessário apertar o bulbo do conta gotas. Uma pequena gota de óleo é suficiente para a observação.**
- 16) Atentamente, gire o revólver para encaixar a objetiva de 100X e ajuste o foco com o micrométrico. **Uma vez utilizado o óleo de imersão na objetiva de 100X, jamais retorne para as outras objetivas (que não necessitam de óleo), pois o óleo suja as lentes e interfere na visualização.**
- 17) **Após a visualização na objetiva de 100X, o óleo de imersão deve ser removido da objetiva logo após o uso com um pedaço de algodão embebido em solução de limpeza (éter/etanol).**
- 18) Anote qual é a abertura numérica (AN) de cada lente objetiva.
- 19) Terminada a observação, encaixe a objetiva de menor aumento, abaixe totalmente a platina, deixe a intensidade de luz no mínimo e desligue-a, retire a lâmina, limpe o microscópio, cubra-o com a capa e guarde-o.
- 20) **Como conduta de boas práticas de laboratório, guarde todo o material utilizado durante a aula e limpe a bancada com álcool 70%, deixando-a limpa.**

ESQUEMAS DO MATERIAL VISUALIZADO

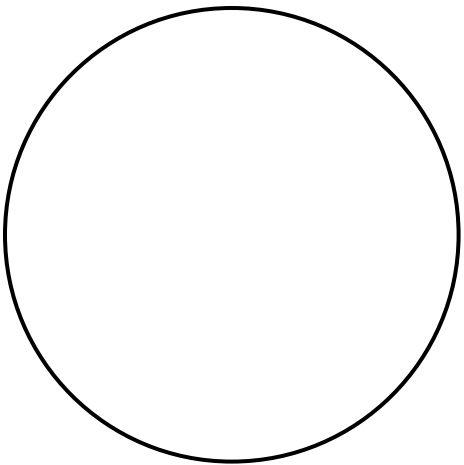
Aumento de 40X



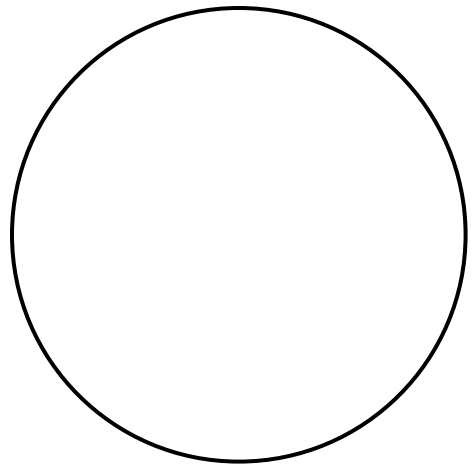
Aumento de 100X



Aumento de 400X



Aumento de 1.000X



D. Questões

- 1) Como fica a imagem de um material ao microscópio quando comparada com a disposição do mesmo na lâmina?
- 2) O que acontece com o campo de visão quando se aumenta o tamanho da imagem?
- 3) O que a manipulação do micrométrico nos permite observar?
- 4) Complete a tabela abaixo com os dados observados no microscópio, conforme mostrado na figura a seguir:



Inscrições nas lentes objetivas

Microscópio (Marca e modelo, se disponíveis)				
Ampliação da ocular				
Ampliação das objetivas	4X	10X	40X	100X
Ampliação total				
Abertura numérica				
Limite de resolução				

Para realizar os cálculos, considere:

Ampliação total = ampliação da ocular x ampliação da objetiva.

Limite de resolução (LR) = $k \times \lambda / AN$, onde:

$k = 0,61$ (constante)

$\lambda = 0,55$ (em μm , é o comprimento de onda que corresponde à radiação na banda do amarelo-verde e para a qual o olho humano apresenta maior sensibilidade).