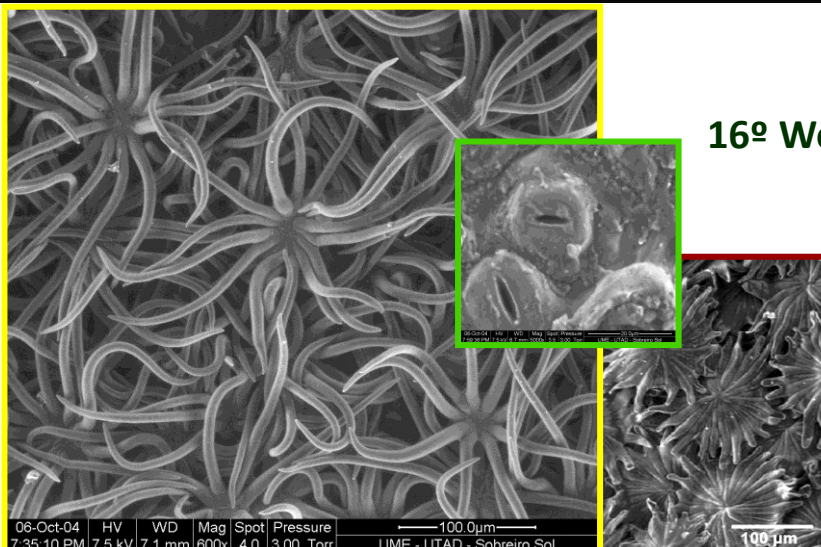


Centre for the Research and Technology of
Agro-Environmental and Biological Sciences

Preparação de amostras biológicas para análise por microscopia eletrónica de varrimento

Teresa Maria Pinto (tpinto@utad.pt)



16º Workshop SEMAT/UM - Caracterização Avançada de Materiais

Técnicas de preparação de amostras para análise por
Microscopia Eletrónica (TEM, SEM, STEM)

Universidade do Minho
17 Outubro 2012



Preparação de amostras biológicas para análise por SEM

Sumário:

1. Introdução

2. Técnicas de preparação de amostras biológicas para SEM

Processamento simples das amostras sem fixação

Processamento simples das amostras com fixação

Desidratação das amostras pelo método do ponto crítico

Recobrimento das amostras (sputtering)

3. Resultados



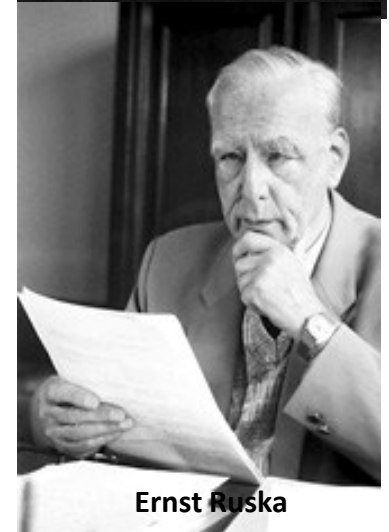
1. Introdução: **Microscopia eletrónica**

A descoberta do Microscópio Eletrónico assenta na investigação de Broglie (1924), sobre a natureza ondulatória dos eletrões e do menor comprimento de onda das radiações UV.



Louis De Broglie

A conceção de um microscópio eletrónico tornou-se realidade após a construção de lentes eletromagnéticas por Ruska, ao que se seguiu a construção do primeiro microscópio eletrónico entre 1931 e 1933.

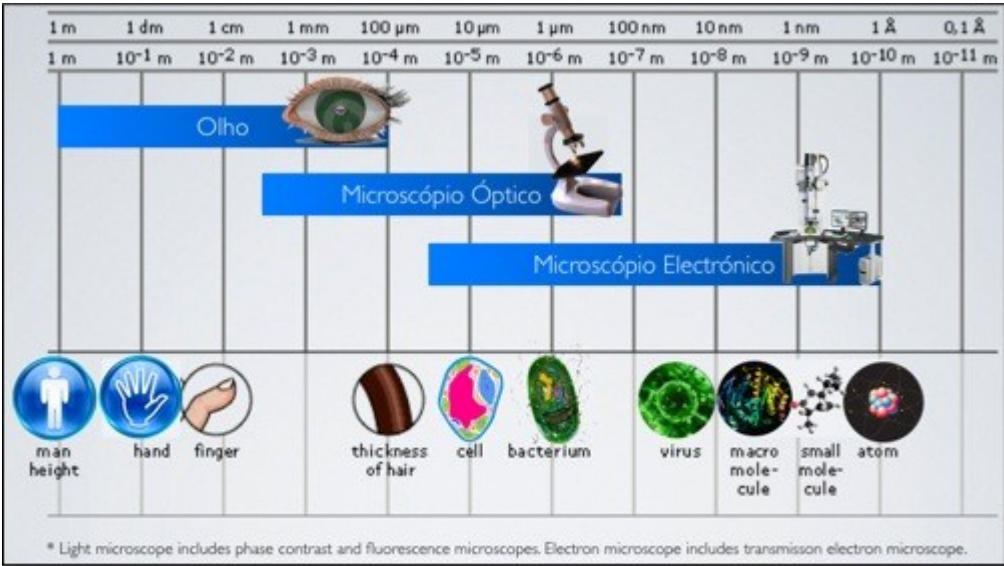


Ernst Ruska



1. Introdução: **Microscópia eletrónica**

Poucos instrumentos apresentam uma gama tão variada de utilizações como o ME nas suas diferentes configurações. A **microscopia eletrónica é particularmente requerida** nos domínios: da biologia, geologia, química, ciência dos materiais, indústria têxtil, odontologia, farmácia, engenharia, metalurgia, física e medicina.





1. Introdução:

Microscópio eletrónico de varrimento(SEM)

É o mais versátil equipamento para avaliação, exame e análise das características microestruturais de amostras biológicas e não-biológicas. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida; valores da ordem de 2 a 5 nm são conseguidos por instrumentos comerciais, instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (NAGATANI et al. 1987).

Outra característica importante do SEM é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo.



1. Introdução: Processamento de amostras

Muitos métodos de preparação de amostras têm apresentando bons resultados na visualização de materiais biológicos e não biológicos (Kessel & Shih, 1976; Hayat, 1972; Dawes, 1971; Hall & Hawes, 1991; Dykstra, 1993).

Devido às características das amostra biológicas o seu processamento pode apresentar alguma complexidade. Contudo, alguns equipamentos de SEM ao operarem com baixo vácuo/modo ambiental permitem a obtenção de imagens de grande qualidade sem qualquer tratamento preliminar.

2. Técnicas de preparação de amostras biológicas : Considerações gerais



- A amostra deve ser representativa do todo;
- Deve possuir dimensões mínimas necessárias para o estudo;
- A manipulação com pinça deve ser minimizada, preferindo-se um pincel fino;
- O material deve ser estabilizado por fixação, geralmente química.

2. Técnicas de preparação de amostras biológicas : Considerações gerais



Fixação

Na formulação do fixador, as condições ideais de concentração, pH, molaridade, etc., ajustam-se de acordo com o material. O fixador é geralmente aplicado à temperatura ambiente, por imersão. O tempo de ação do fixador pode ser de algumas horas a vários dias, quando o objetivo é aumentar a rigidez do espécime.

Os fixadores mais vulgares são o líquido de Bouin, o glutaraldeído, FAA, tetróxido de ósmio.....



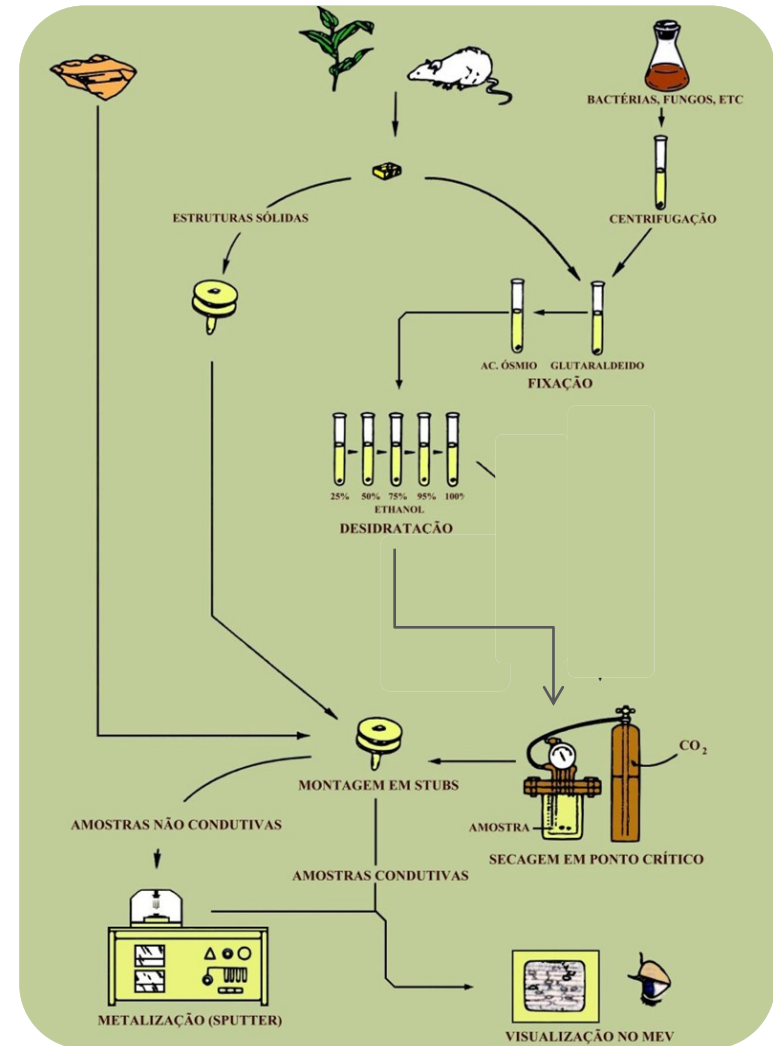
2. Técnicas de preparação de amostras biológicas :

Escolha do processamento

A escolha vai sempre depender das características da amostra.

Tratando-se de amostras biológicas a percentagem de água é sempre muito elevada (aproximadamente 75%).

Se dispusermos de um equipamento que permita funcionar em modo ambiental ou baixo vácuo e amostras pouco sensíveis, então podemos proceder a um processamento simples.

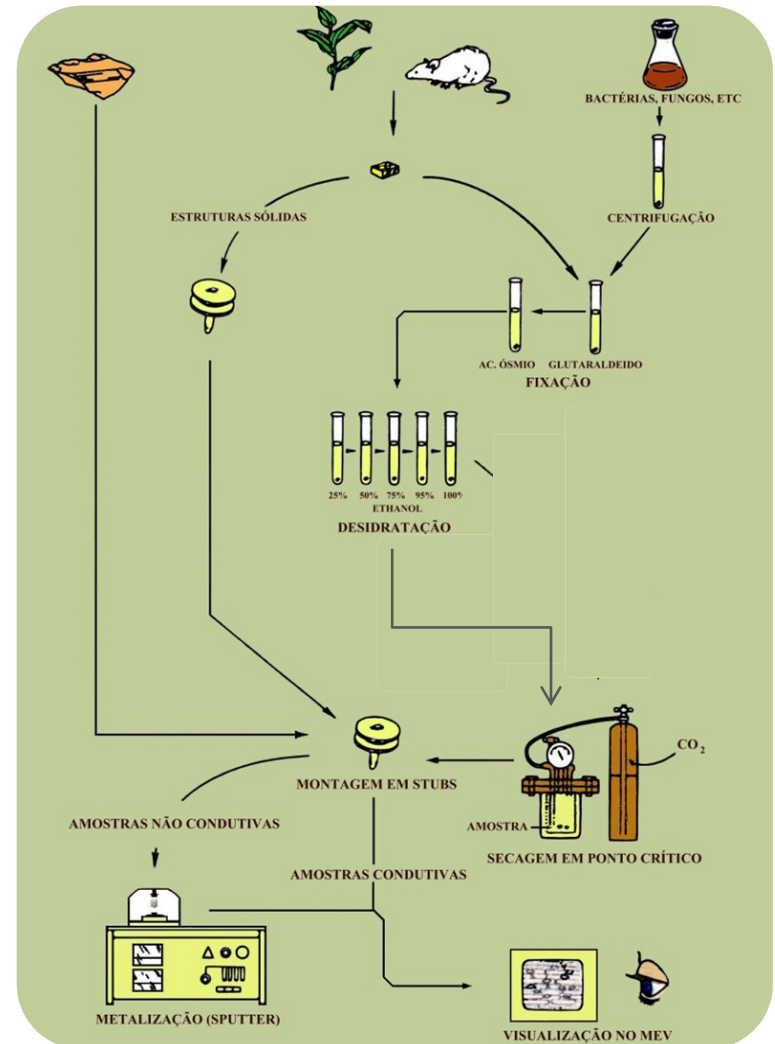




2. Técnicas de preparação de amostras biológicas : Escolha do processamento

Se não possuímos um equipamento ESEM e/ou a amostra não for condutora o procedimento deverá seguir a ordem:

- fixação;
- desidratação;
- desidratação a ponto crítico (CPD);
- recobrimento (sputtering).

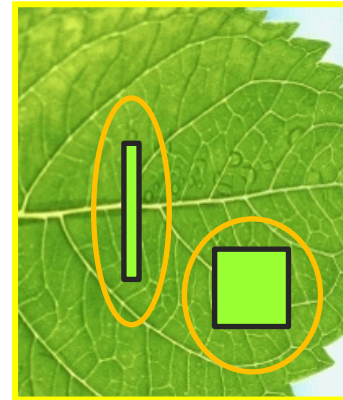




2. Técnicas de preparação de amostras biológicas :

processamento simples (sem fixação)

a. Cortar a amostra com bisturi



b. Montagem no porta amostras



Pino de alumínio



Fita cola de dupla face

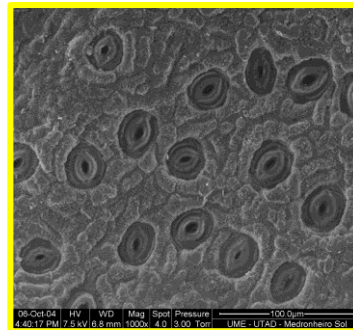
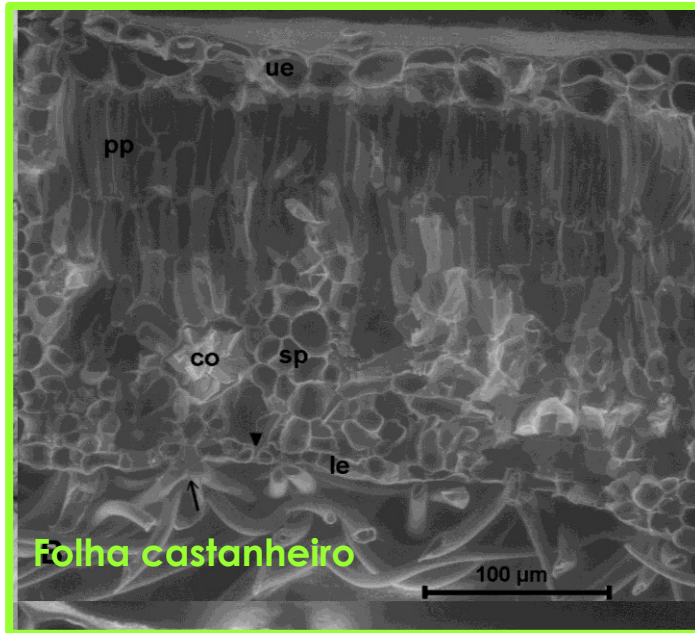


Cola de carbono

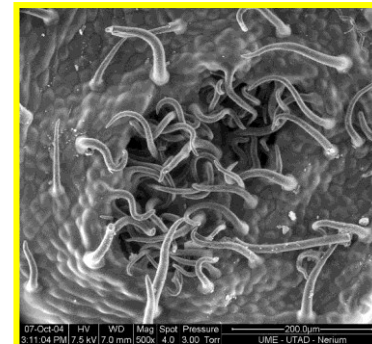


Técnicas de preparação de amostras biológicas :

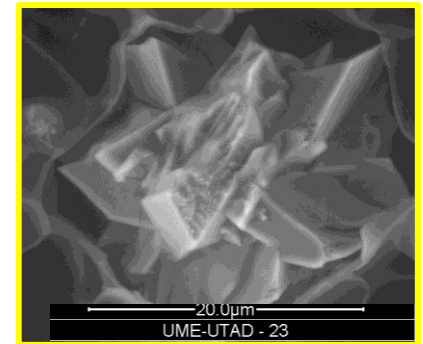
Resultados - sem fixação Fotos (UME-UTAD)



Estomas



Cripta pilifera

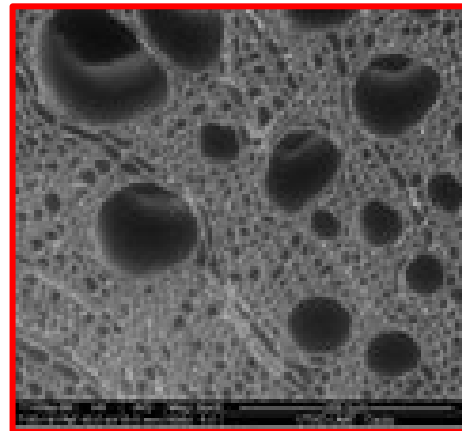
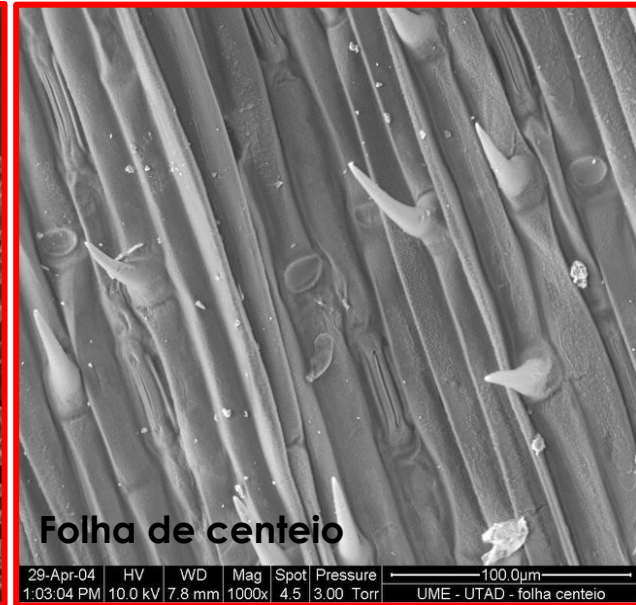


Cristal de CaC₂O₄

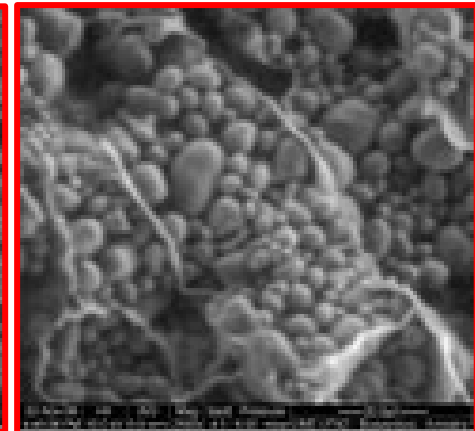


Técnicas de preparação de amostras biológicas :

Resultados - sem fixação Fotos (UME-UTAD)



Xilema do caule de castanheiro



Amido de castanha

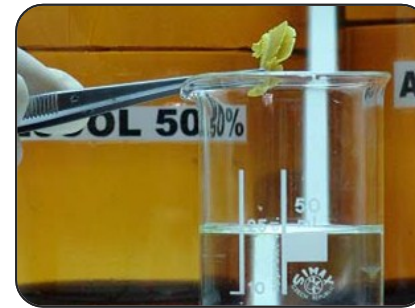


Centre for
the Research and
Technology of
Agro-Environmental
and Biological
Sciences



2. Técnicas de preparação de amostras biológicas : processamento simples (com fixação)

1. Fixação líquido de Bouin/FAA/...



2. Desidratação com álcool

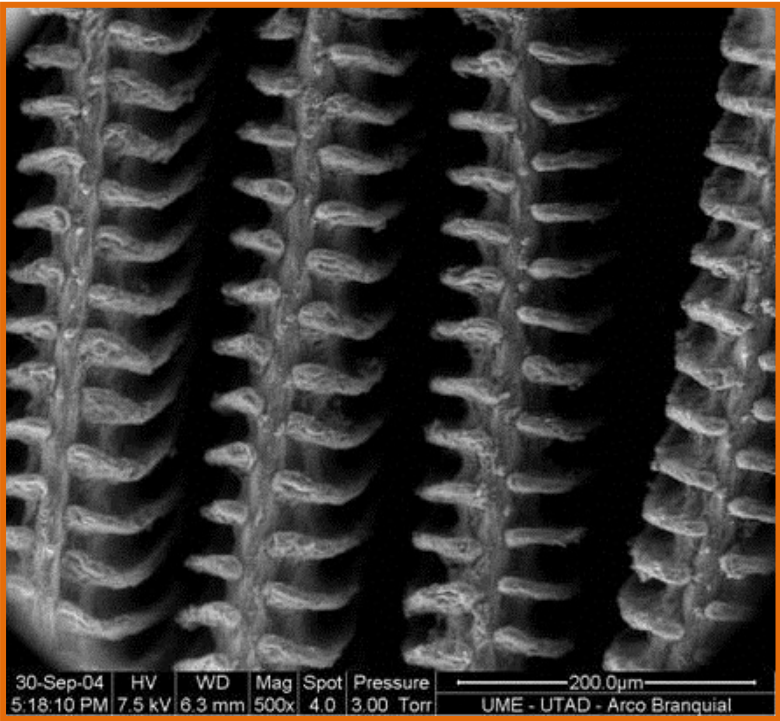
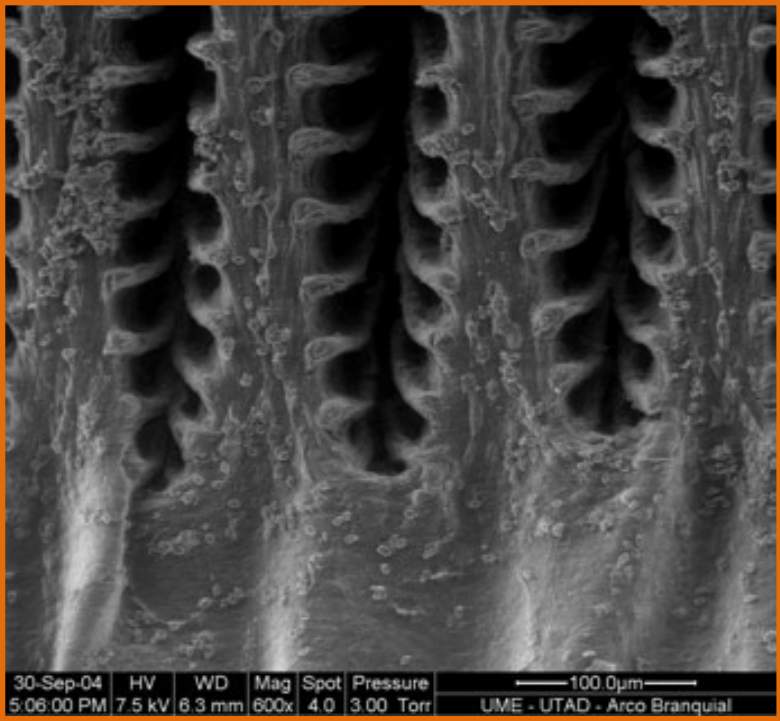




2. Técnicas de preparação de amostras biológicas :

Resultados - com fixação

Fotos (UME-UTAD)



Arco branquial da tilapia

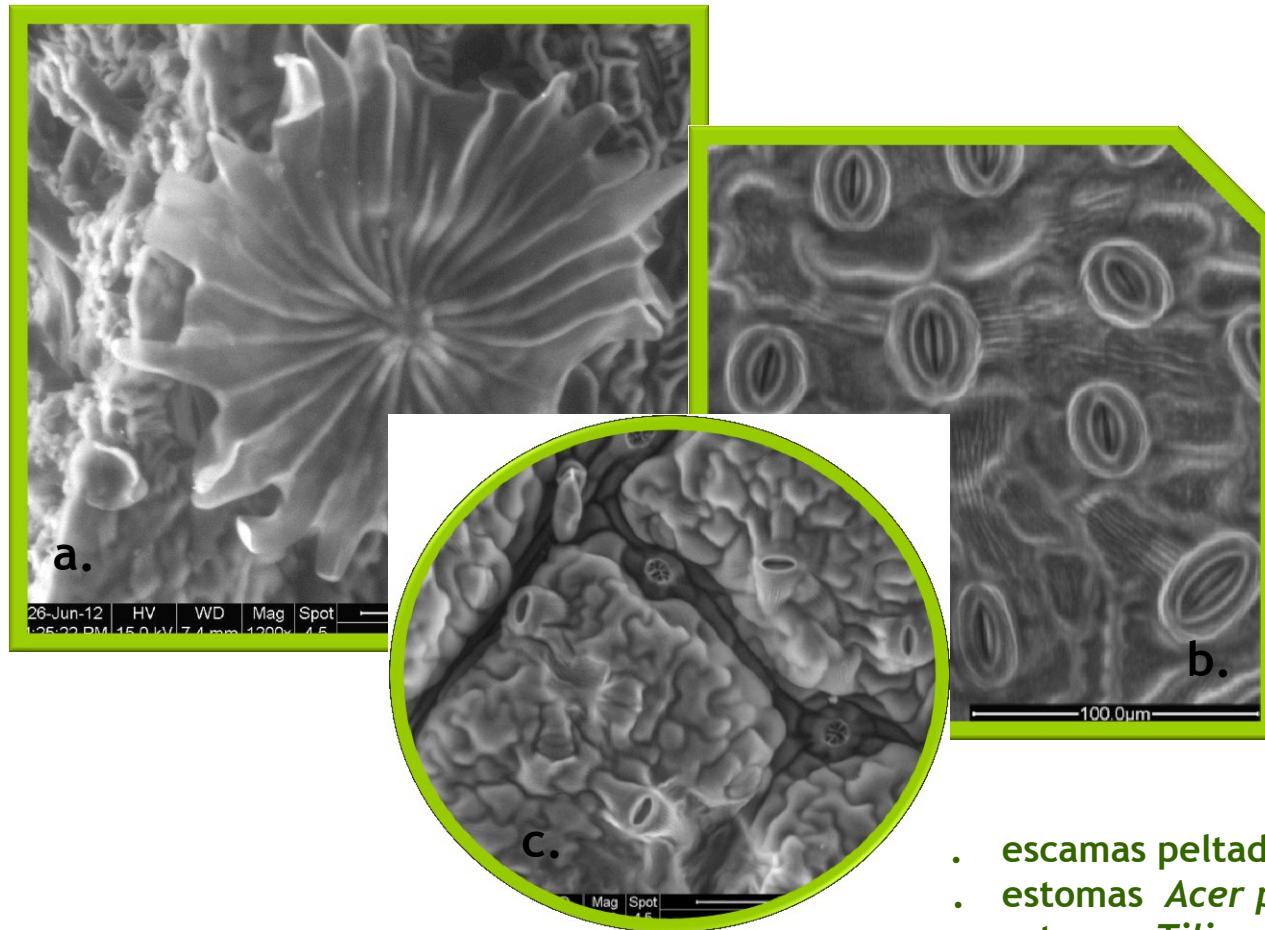




2. Técnicas de preparação de amostras biológicas :

Resultados - com fixação

Fotos (UME-UTAD)



- . escamas peltada folha oliveira
- . estomas *Acer platanoides*
- c. estomas *Tilia platyphyllos*



2. Técnicas de preparação de amostras biológicas :

Desidratação ao ponto crítico (CPD)

Este método envolve várias etapas:

- Fixação de amostras durante 2h até 24h , podendo ser mais;
- Lavagem em solução tampão;
- Desidratação em banhos duplos de álcool (ou acetona): 30, 50, 70,80, 95% e 100% de concentração. Garantir a total remoção da água.
- Desidratação das amostras ao ponto crítico (CPD-critical point drying)
- Montagem no suporte porta-amostra (stub)





2. Técnicas de preparação de amostras biológicas :

Recobrimento (sputtering)

Devido à necessidade de interação do feixe de eletrões com a amostra, alguns eletrões são absorvidos pela amostra que deve conduzi-los para o fio terra, por isso, **é importante que as amostras sejam condutoras**. Caso isto não ocorra, é possível torná-las condutoras através de vários processos físicos como evaporação ou a deposição de iões (sputtering).

Outro motivo para o recobrimento das amostras, é o de que as camadas depositadas melhoram o nível de emissão de eletrões, emitem mais eletrões que o material da amostra, facilitando a construção da imagem (GOLDSTEIN et al., 1992)



2. Técnicas de preparação de amostras biológicas :

Recobrimento (sputtering)

A camada condutora é geralmente ouro ou liga de ouro/paládio ou ainda carbono, evaporados em vácuo. Estes são usualmente depositados pelo processo de "sputtering".



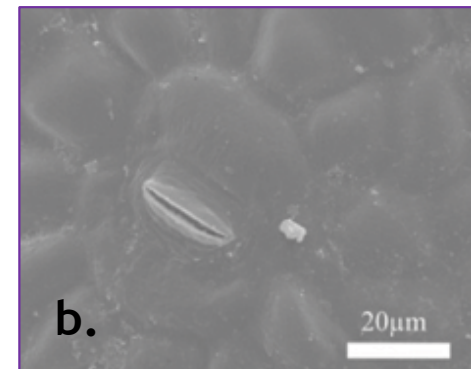
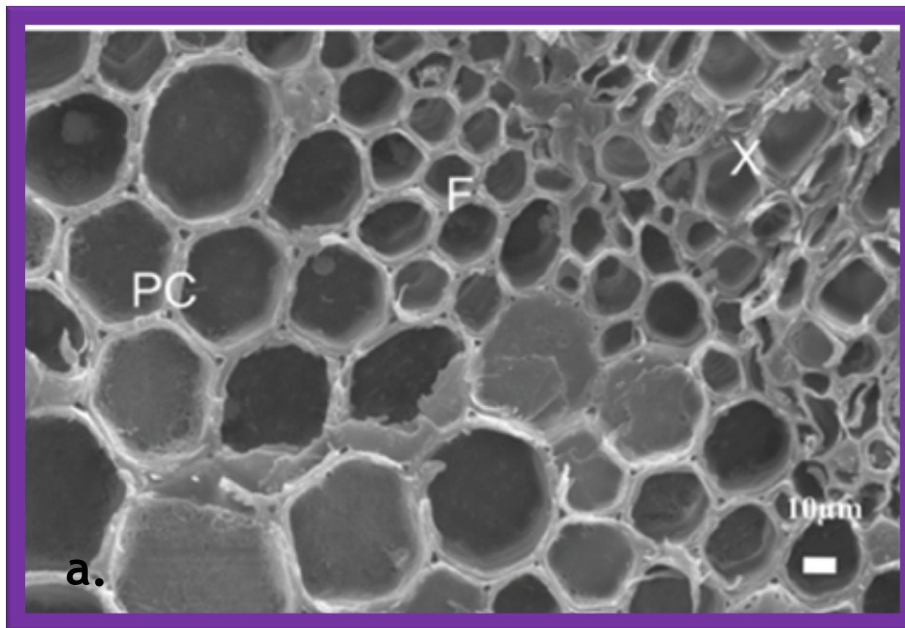
Sputter



2. Técnicas de preparação de amostras biológicas :

Resultados - desidratação ao ponto crítico e sputtering

Fotos (Pereira e colaboradores UFL Brasil)



- a. Vaso condutor do caule de cafeeiro
- b. estomas de cafeeiro



Técnicas de preparação de amostras biológicas : **resumo**

