

## Sesión Teórico-Práctica 5

### Manipulación de muestras para su estudio al Microscopio Electrónico<sup>1</sup>

#### PARTE PRÁCTICA<sup>2</sup>

5.A.- Procesado de Muestras para el Microscopio Electrónico de Barrido

5.B.- Manipulación del SEM.

#### Objetivos

1. Adquirir destrezas la manipulación de muestras y la realización de preparaciones para microscopía electrónica de barrido
2. Comparar la microscopía óptica con la microscopía electrónica de barrido en estudios morfológicos.

#### Materiales

##### Instrumentales:

- Pipetas Pasteur
- Placas de petri
- Serie de deshidratación de etanol: 80%, 90%, 95% y 100%
- Serie final de deshidratación: acetona 50%/etanol absoluto 50%; acetona 100%
- Agente desecador Hexametildisilazano
- Pedestales metálicos y cinta conductora
- Pinzas
- Aguja
- Tijeras

##### Muestras:

- Muestra de un Artrópodo Insecto: adulto de díptero sarcosaprófago
- Muestra de un Artrópodo Quelicerado: ácaro edáfico
- Muestra de un Artrópodo Insecto: ninfa de efemeróptero
- Muestra de fibras y tejidos de diferente naturaleza: lino, algodón, lana y sintético. También se tratará una muestra problema etiquetada como A.
- Muestra de cabellos de distintas partes corporales y de distinta naturaleza. También se tratará una muestra problema etiquetada como B

---

<sup>1</sup> Este documento está sujeto a una licencia Creative Commons



<sup>2</sup> La procedencia y autoría de las imágenes y esquemas utilizados se encuentra al final del texto

## Trabajo a realizar

### **A.- Experiencia 1. Montaje de material biológico previa deshidratación y desecación.**

Se van a preparar los mismos organismos que estudiamos en las experiencias 2 y 3 de la sesión práctica 3: una mosca, un ácaro, y una efémera. El uso de la microscopía electrónica convencional y concretamente el microscopio electrónico de barrido, que es el instrumental que vamos a utilizar, requiere que la muestra esté deshidratada y, en este caso, desecada. Ya que, al trabajar en vacío, si la muestra tiene algún rastro de humedad puede generar interferencias en su observación y un mal funcionamiento del SEM. Después de la fijación, la desecación es el paso más comprometido en la preparación del material biológico, ya que si ésta no se realiza adecuadamente, la muestra se puede colapsar y no conservar su aspecto natural.



#### **Desarrollo Metodológico**

1<sup>er</sup> paso. Deshidratación: las muestras se deshidratarán en una serie de baños de etanol de concentración creciente hasta etanol absoluto. Posteriormente se llevarán a acetona al 100%, previo paso por una mezcla de 50% etanol/acetona al 100%. Las muestras permanecerá entre 10 y 15' en cada baño, pero si alguna de éstas fuera muy grande sería conveniente que permanezca un mayor tiempo.

2<sup>o</sup> paso. Desecación: las muestras que estaban en acetona (líquido de intermediario) se introducen en un baño de Hexametildisilizano (HMDS) (líquido de transición), que es el producto químico que va a permitir una desecación al aire muy rápida, prácticamente súbita, sin que se vea la morfología de la muestra alterada. Las muestras deben estar en este agente químico entre 10 y 15', aunque al igual que indicamos en el paso anterior, si la muestra es grande se necesitaría un mayor tiempo de permanencia. Una vez transcurrido este tiempo la muestra se sitúa sobre un papel secante y se deja secar al aire hasta estar seguros que sea desecado completamente. Para saberlo, la muestra quedará suelta del papel secante adquiriendo un color pálido o blanquecino y aspecto quebradizo. Con mucho cuidado, cogeremos la muestra con unas pinzas y la situaremos sobre uno de los pedestales metálicos, a los que previamente se le habrá

puesto cinta adhesiva conductora de doble capa. Una vez colocados ya están preparados para el siguiente paso

3º paso. Metalización: las muestras desecadas y colocadas en su pedestal se llevarán al Servicio de Microscopía de la Universidad de Murcia (SUM) para que sean metalizadas con Au-Pd. Este proceso se lleva a cabo por el personal técnico del SUM. Una vez realizada la metalización, ya podrán analizarse al SEM.



### **Tareas y Cuestiones:**

*¿Qué procedimiento de preparación para estudiar muestras al microscopio te ha parecido más complicado o engorroso? Razona tu respuesta.*

### **B.- Experiencia 2. Montaje de material inerte de origen biológico sin deshidratación y desecación.**

Las muestras de origen biológico que por su naturaleza carecen de humedad o, bien, son lo suficientemente resistentes para que no pierdan su estructura y organización tras un tiempo prolongado al aire, no requieren de ningún método de desecación o deshidratación. Aunque si es importante una limpieza de su superficie de grasas u otros impurezas, utilizando para ello etanol o acetona al 100%. En ocasiones, puede ser convenientemente dejar las muestras cierto tiempo en una estufa para asegurarnos que está completamente secas. Ejemplo de este tipo de material que se podrán estudiar son las uñas, el pelo, algunas fibras naturales manufacturadas, etc.



### **Desarrollo Metodológico**

Se cogen las muestras y se limpian introduciéndolas en un baño de etanol o acetona al 100% durante unos 5'; si es posible se utilizará un baño de ultrasonidos para facilitar el proceso. Posteriormente se sacan de este baño y se dejan secar al aire sobre un trozo de papel secante o de filtro. Finalmente, se colocan directamente sobre un pedestal provisto de cinta conductora de doble capa para su inmediata metalización.

### **C.- Experiencia 3. Montaje de material inerte de origen no biológico: cerámico o metálico.**

Con las muestras de materiales inertes no biológicos se procede de la misma forma que en la experiencia 2, siendo también necesario en ocasiones su limpieza y su paso breve

por la estufa para asegurar una completa desecación. Las muestras no metálicas han de ser necesariamente metalizadas como en las muestras de origen biológico, mientras que las metálicas pueden ser introducidas en el SEM directamente, aunque dependiendo de su grado de conductividad, puede ser necesario en ocasiones una metalización ligera, a fin de observar con más nitidez y claridad su superficie.



### **Desarrollo Metodológico**

Se cogen las muestras limpias, que pueden haberse secado en la estufa o simplemente al aire, y se colocan directamente sobre un pedestal provisto de cinta conductora de doble capa para su inmediata metalización, si es necesario.

### **D.- Estudio y análisis de las preparaciones con microscopía electrónica. Posible análisis del material metálico por difracción de rayos X.**

Todas las preparaciones para el SEM se guardarán en un desecador o, en su defecto, una caja provista de silicagel, hasta su metalización y una vez realizada ésta, incluso, hasta su observación al microscopio. Las preparaciones se estudiarán en el SUM de la Universidad de Murcia. A continuación, en la lámina 1, se exponen algunos ejemplos de lo que se observará en el SEM con los materiales que vamos a preparar, cuyas imágenes proceden de los trabajos de los alumnos que cursaron la asignatura.

Una vez en el SUM se explicará a los alumnos el manejo básico del SEM y la toma de muestras digitales, pero durante la observación de las muestras el alumno debe ser autónomo, excepto en aquellos procesos técnicos que debe realizar el personal del SUM, por ejemplo el cambio de muestra. Aunque el alumno estará asistido por el profesor, como esta parte práctica se hace conjuntamente con la de microscopía óptica con contraste físico de la muestra, si alguno no sabe para que sirve un mando del microscopio o lo acciona por error debe comunicarlo inmediatamente al profesor o a algún técnico del SUM. ¡NO intentar solucionarlo solos!

Durante la observación de las muestras al SEM, también se podrán tomar fotografías digitales. Se recomienda que se vayan tomando para poder ilustrar y apoyar la respuesta a las preguntas de la práctica, así como para elaborar el informe final y la resolución a la muestra problema



**Tareas y Cuestiones**

Describe morfológicamente al SEM cada una de las muestras que has preparado y compara tus resultados con los obtenidos al microscopio óptico. ¿Con cuál técnica observas mejor la morfología de las muestras? ¿Cuál te da mejores resultados para un análisis morfológico de las muestras? ¿Puedes ahora dar una identificación inequívoca de las muestras problema A y B? Matiza tu respuesta.

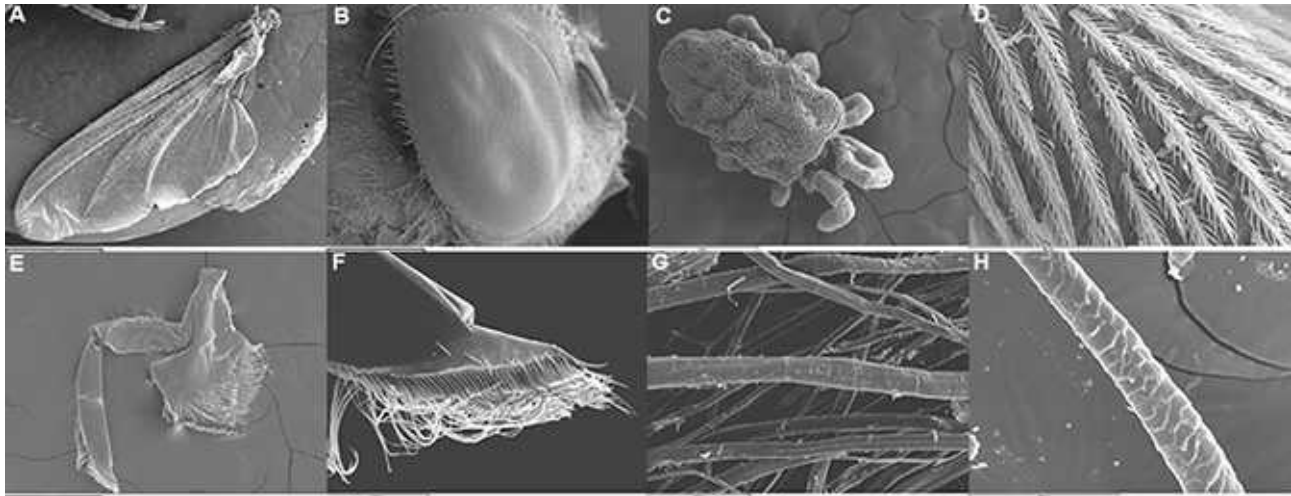


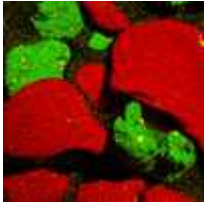

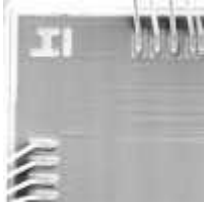
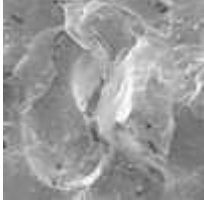
Lámina 1: A.- Aspecto del ala de una mosca; B.- Detalle de la cabeza de la mosca donde se observa principalmente el ojo compuesto y las antenas; C.- Ácaro edáfico; D.- Detalle de las setas (pelos) que cubre el cuerpo del ácaro; E.- Maxila de un efemeróptero; F.- Extremo distal de la maxila del efemeróptero; G.- Filamentos de lino; H.- Filamento de lana.

**Créditos fotográficos**

1. El logo del encabezamiento proceden de la página web <http://ocw.um.es/>
2. Las fotografías de la lamina 1 son autores los alumnos de la asignatura “Técnicas de Microscopía aplicadas a las Ciencias Forenses” del curso 2007/2008 y proceden de sus cuadernos del alumno.

## Ejemplos de Virtual Lab de microscopía electrónica de barrido

Las muestras se pueden descargar de <http://virtual.itg.uiuc.edu/data/>

	<p><b>Costa Rican Sand</b> (EDS): muestra de arena de una playa de Costa Rica. La arena de las playas son frecuentemente mezclas de diferentes tipos de roca y restos de conchas de moluscos. A parte de la diferenciación morfológica de los granos de arena, la utilización de la sonda de rayos X y un espectrografo de difracción de rayos X nos permite identificar la composición química de dichos granos. Cada uno de los elementos tiene un color en la imagen que nos permite conocer dicha composición.</p>
	<p><b>House Fly</b> (3): Visión ventral de una mosca doméstica. Podemos observar el modelo organizativo de las piezas bucales de este insecto.</p>
	<p><b>Pentium Chip</b>: Morfología de la circuitería de un microprocesador Pentium de un ordenador personal.</p>
	<p><b>Fractured Ceramic Cup</b>. Aspecto de la superficie fracturada de un copa de cerámica. La cerámica es un material extremadamente diverso en cuanto a sus propiedades mecánicas, térmicas y eléctricas. El estudio de la textura y porosidad de este material es muy interesante para conocer su dureza.</p>

## Trabajo a realizar

Utilizando el microscopio virtual de la ITG observa las muestras anteriores y determina que diferencias encuentras.

## Créditos fotográficos

1. Figuras de la tabla extraídas de la página web del Virtual Microscope <http://virtual.itg.uiuc.edu>.