

Sesión Teórico-Práctica 5

Manipulación de muestras para su estudio al Microscopio Electrónico¹

PARTE TEÓRICA²

5.1. Naturaleza y origen de las muestras.

5.2. Técnicas de preparación para la microscopía electrónica de barrido: fijación, deshidratación, desecación, montaje y metalización de la muestra.

5.3. Técnicas de preparación para la microscopía electrónica de transmisión: diferencias básicas con las de SEM.

Naturaleza y origen de las muestras

La clasificación de las muestras según su naturaleza y origen es la misma que vimos para la microscopía óptica. Dada las peculiaridades de trabajo en este tipo de microscopía, sobre todo por trabajar en vacío, hay que tener en cuenta que cualquier muestra independientemente de su naturaleza u origen deben estar completamente deshidratadas y desecadas. La visualización de muestras mal deshidratadas o desecadas será muy deficiente o prácticamente imposible, excepto en (ESEM), que sí permite la visualización de este tipo de muestras. Por otro lado, las muestras inertes metálicas que conducen bien la electricidad se pueden observar directamente al SEM, pero el resto han de ser metalizadas (cubiertas de un metal conductor).

Técnicas de preparación para la microscopía electrónica de barrido: fijación, deshidratación, desecación, montaje y metalización de la muestra

La preparación de muestras al SEM requieren de un proceso que no es ni complejo ni laborioso, aunque algunos de sus pasos deben ser muy preciso, como es el caso de la desecación, para que la muestra se conserve lo más cercana a la realidad.

Fijación: Las muestras que se van a estudiar al SEM no requiere de una fijación específica o distinta a las ya indicadas en las técnicas de microscopía tratadas, es decir tanto las muestras fijadas para microscopía óptica como para el TEM pueden ser

¹ Este documento está sujeto a una licencia Creative Commons



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

observadas satisfactoriamente en este tipo de microscopía. En general, la mayoría de estudios al SEM suelen decantarse por fijadores aldehídicos, ya que son los mayoritariamente utilizados para el TEM.

Postfijación. La postfijación en las muestras preparadas para el SEM es completamente facultativa, encontrando tanto referencias bibliográficas en las que esta etapa esta considerada en el protocolo de tratamiento de la muestras, como referencias en las que se obvia completamente. El tetróxido de osmio es el postfijador más utilizado, tanto por su capacidad de fijar los lípidos, como por favorecer ligeramente el contraste de la muestra, sobre todo en aquellas cuyo patrón morfológico es muy sutil.

Deshidratación: para el estudio al SEM, al igual que la TEM, la muestra se ha de deshidratar, ya que algo de humedad dentro de la cámara provocaría un mal funcionamiento del microscopio, ya que el vacío no sería adecuado y el haz de electrones se perturbaría. Normalmente la deshidratación se realiza en un gradiente creciente de alcoholes etílicos hasta etanol absoluto, aunque en algunos casos es necesario deshidratar las muestras hasta acetona. El último compuesto de la deshidratación se denomina líquido intermediario.

Desecación: la desecación es el paso por el cual la muestra pierde súbitamente toda sustancia líquida, sin que se vea mermada la estructura o morfología de ésta. Para ello se utiliza un líquido de transición que tiene una sublimación muy rápida, para evitar toda tensión superficial y que la muestra conserve un aspecto lo más cercano posible a estado natural. Existen diversas formas de llevar a cabo la desecación, pero las que mejor rendimiento dan son: el punto crítico y el tratamiento con compuestos orgánicos volátiles. El punto crítico se realiza en un dispositivo donde, a una temperatura de 31° y una presión de 74 bar, el CO₂ líquido desplaza a la acetona completamente, para posteriormente despresurizar sublimando el CO₂ a gas de manera súbita (lámina 1). En el otro método, la acetona se ve desplazada por un líquido orgánico de alta volatilidad, como el hexametildisilizano (HMDS), que a temperatura y presión ambiental evaporará rápidamente.

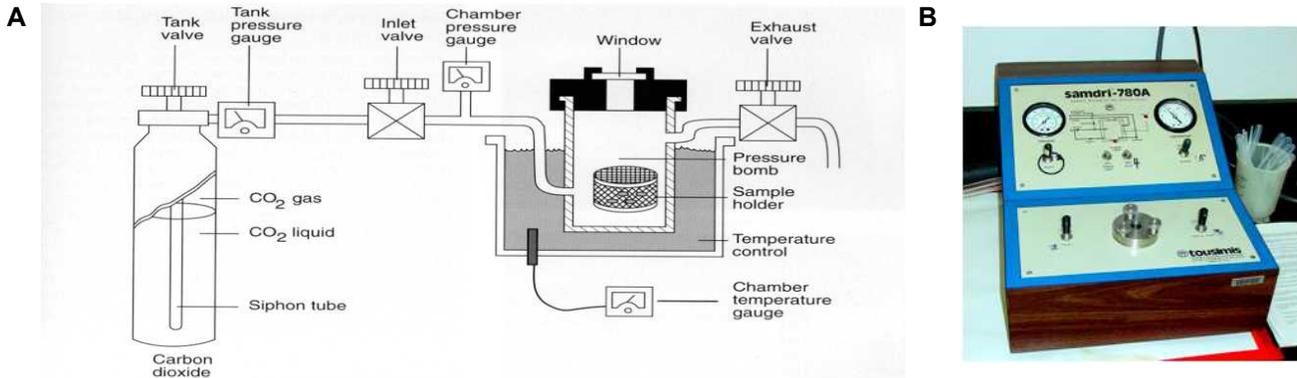


Lámina 1. A.- Esquema del proceso de desecación mediante punto crítico de una muestra para el SEM; B.- Aspecto de un desecador de punto crítico

Montaje: La muestra una vez desecada se ha de montar sobre un pedestal metálico provisto de cinta adhesiva conductora de doble capa, que sujeta firmemente a ésta (lámina 2).



Lámina 2. A.- Pedestales para el montaje de muestras al SEM; B.- Cinta conductora de doble capa y pegamentos conductores especiales para fijar las muestras al SEM

Metalización: La metalización consiste en cubrir la muestra con un metal conductor como el Au, el Pd o el Pt, y se realiza en vacío en un metalizador (lámina 3). Cuando la muestra se va a analizar con difracción de rayos X se suele cubrir con polvo de carbón.

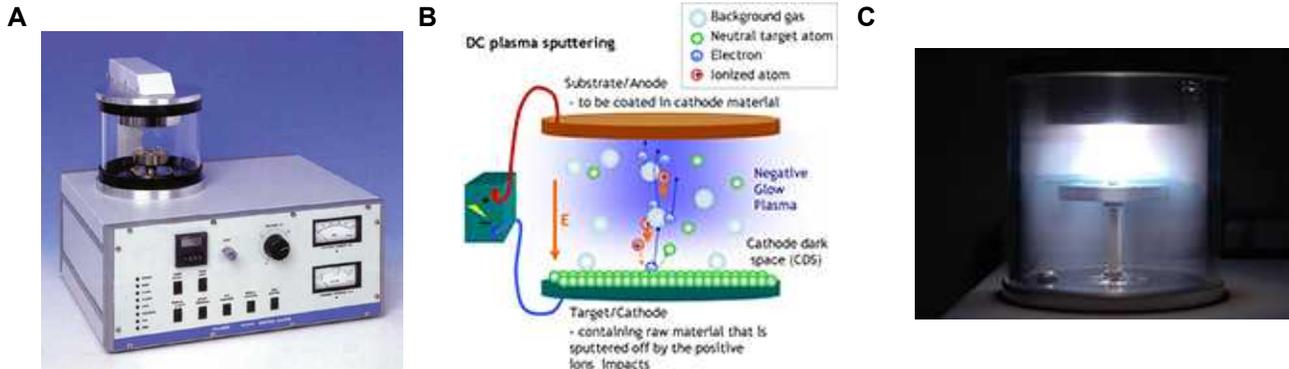


Lámina 3. A.- Metalizador Polarlon SC7640; B.- Esquema del proceso de metalización, la cámara de metalización se encuentra rellena de un gas inerte (Ar) y está provista de dos placas polarizadas enfrentadas, un ánodo donde se encuentra la muestra a metalizar y un cátodo donde se encuentra la placa del metal (Au, Pd o Pt) que desprenderá los átomos de recubrimiento. Al provocar una diferencia de potencial entre los polos de la placa los electrones chocan con los átomos del gas inerte que choca contra el la placa de metal desprendiendo los átomos de metal que son atraídos hacia la muestra y provocando que esta quede cubierta. C.- Imágen de la cámara de metalización funcionando donde se observa una nube eléctrica como efecto de la diferencia de potencial entre los polos.

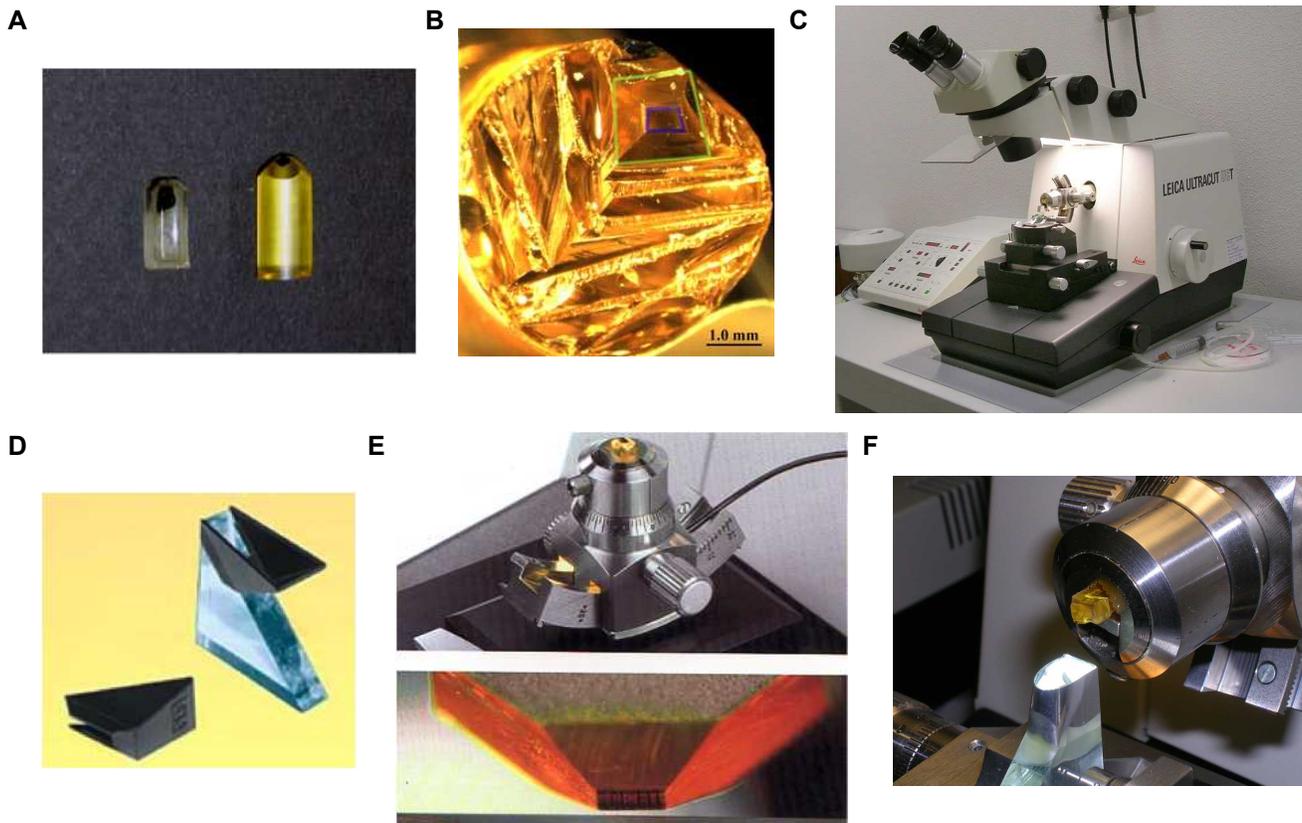
Técnicas de preparación para la microscopía electrónica de transmisión: diferencias básicas con las de SEM

La preparación de las muestras del TEM es mucho más laboriosa que la del SEM y requiere una formación técnica mayor. Algunas de los pasos que son específicos del TEM son:

- **Fijación:** debe ser más correcta y precisa que en ningún otro tipo de microscopía, dados los aumentos y resolución del microscopio que alcanza este tipo de microscopio. Generalmente las muestras se fijan con compuestos aldehídicos, simples o mixtos.
- **Postfijación:** suele ser obligada y se realiza normalmente con tetróxido de osmio, que estabiliza las grasas y mejora el contraste de la muestra, ya que desvía enormemente los electrones; se puede considerar un colorante electrónico
- **Inclusión:** se suele realizar en resinas sintéticas, las más comunes son las derivadas del epoxi, aunque también se utilizan otras como las acrílicas o el policarbonato. Al final de este proceso se obtienen bloques de resina con la muestra en un extremo (lámina 4A), que se han de tallar antes de realizar el proceso de corte (lámina 4B).
- **Cortes:** la muestra necesariamente ha de cortarse en cortes ultrafinos, ya que cortes

por encima de 0,5 micras (5000Å) son opacos a los electrones. Los cortes al ser tan finos se realizan en microtomos especiales que necesitan cuchillas de cristal o diamante (lámina 4 C-F) y, cada sección, queda flotando en un baño de agua para luego ser recogida en los rejillas de montaje (lámina 5 A-B).

- **Montaje:** Normalmente los cortes se colocan en una rejilla como soporte aunque, en ocasiones, cuando la muestra es muy débil, se utiliza una finísima capa de Formvar (75 a 100 Å), que tiene una función parecida a un portaobjetos (lámina 5 C-F).
- **Post-tinción:** Este paso tiene como misión contrastar aun más la muestra, utilizando sales de metales pesados como el acetato de uranilo y el citrato de plata (lámina 5G).



Lamina 4. A.- Bloques de inclusión para el TEM; B.- Aspecto del tallado de un bloque; C.- Ultramicrotomo para cortar bloques y obtener cortes semifinos (0,5 µm), son secciones de toda la muestra y se estudian en un microscopio óptico para decidir la parte de la muestra que interesa, y ultrafinos (75 a 100 Å), son secciones de tamaño más pequeño y se corresponden con la parte de la muestra que interesa; D.- Cuchillas de vidrio y soporte para recoger la sección de muestra (contienen agua); E.- Bloque de inclusión en el soporte del microtomo y posición de la muestra respecto a la cuchilla (franja gris de la parte baja de la fotografía); F.- Aspecto de la disposición del bloque de inclusión y la cuchilla

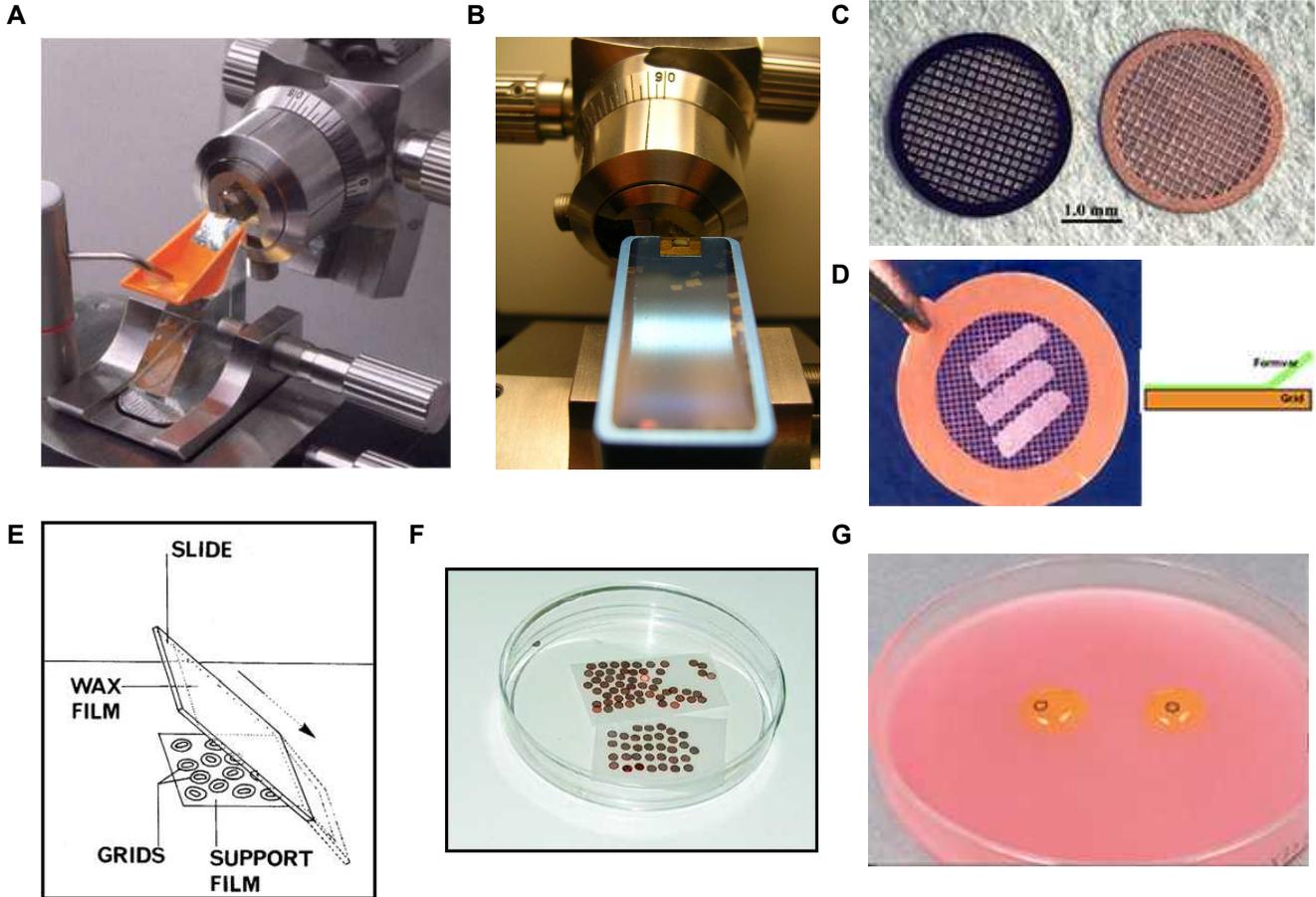


Lámina 5. A y B.- Secciones de muestra en el dispositivo de recogida de muestra asociado a la cuchilla; C.- Rejillas para colocar la sección de muestra, aspecto de la muestra sobre la rejilla y rejilla con capa de Formvar; E.- Colocación de la capa de Formvar a las rejillas; F.- disposición de las rejillas sobre la capa de formvar; G.- Tinción con acetato de uranio de las secciones de muestra una vez cortadas y colocadas en la rejilla

Figura 1.- Resumen de los pasos que se siguen en la fijación e inclusión de la muestra para conseguir un bloque de resina destinado a obtener cortes semifinos y ultrafinos

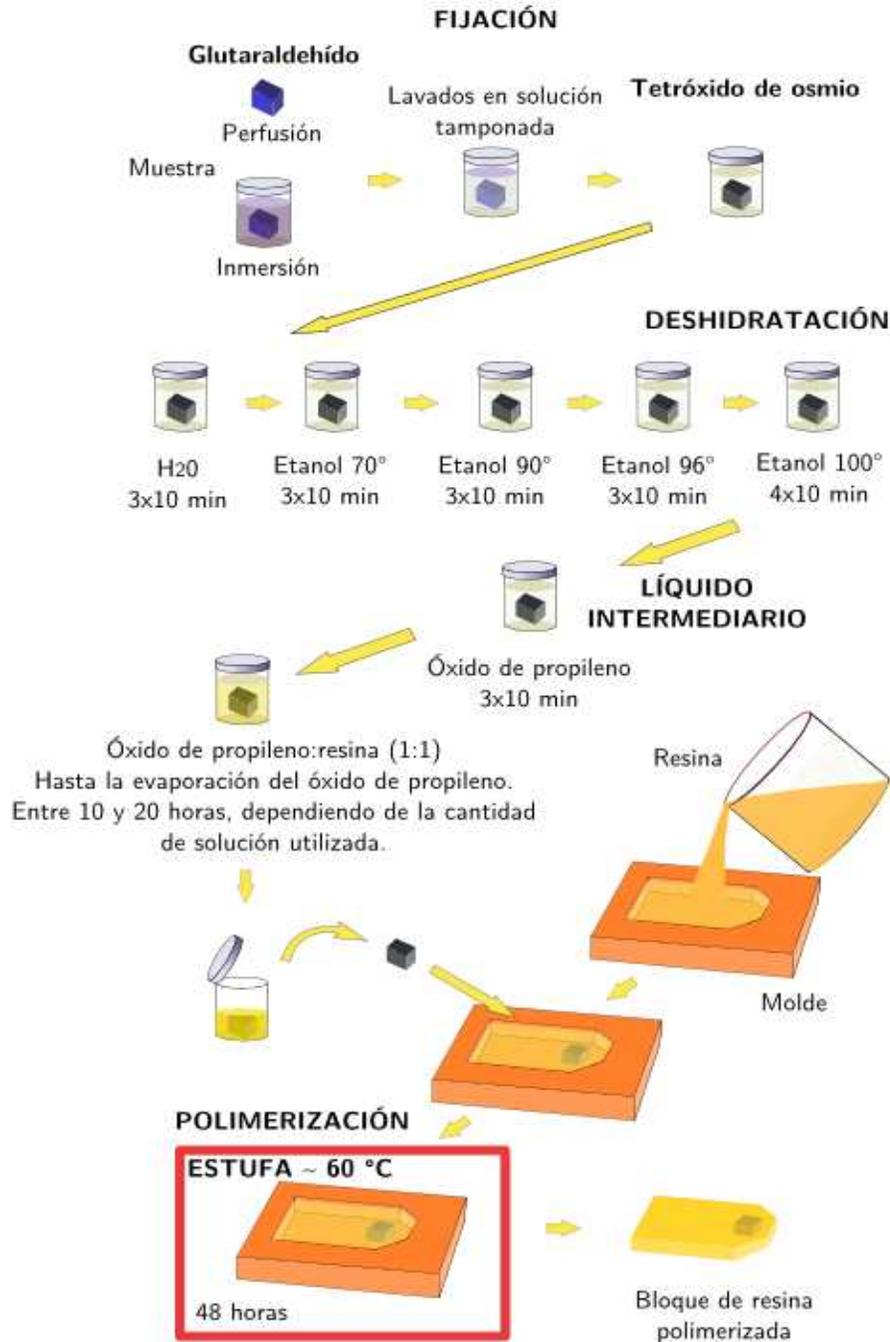


Figura 2.- Resumen de los pasos que se siguen en la preparación y tinción de un corte semifino, paso previo necesario para estudiar la muestra y decidir de que parte de ésta se realizarán los cortes ultrafinos

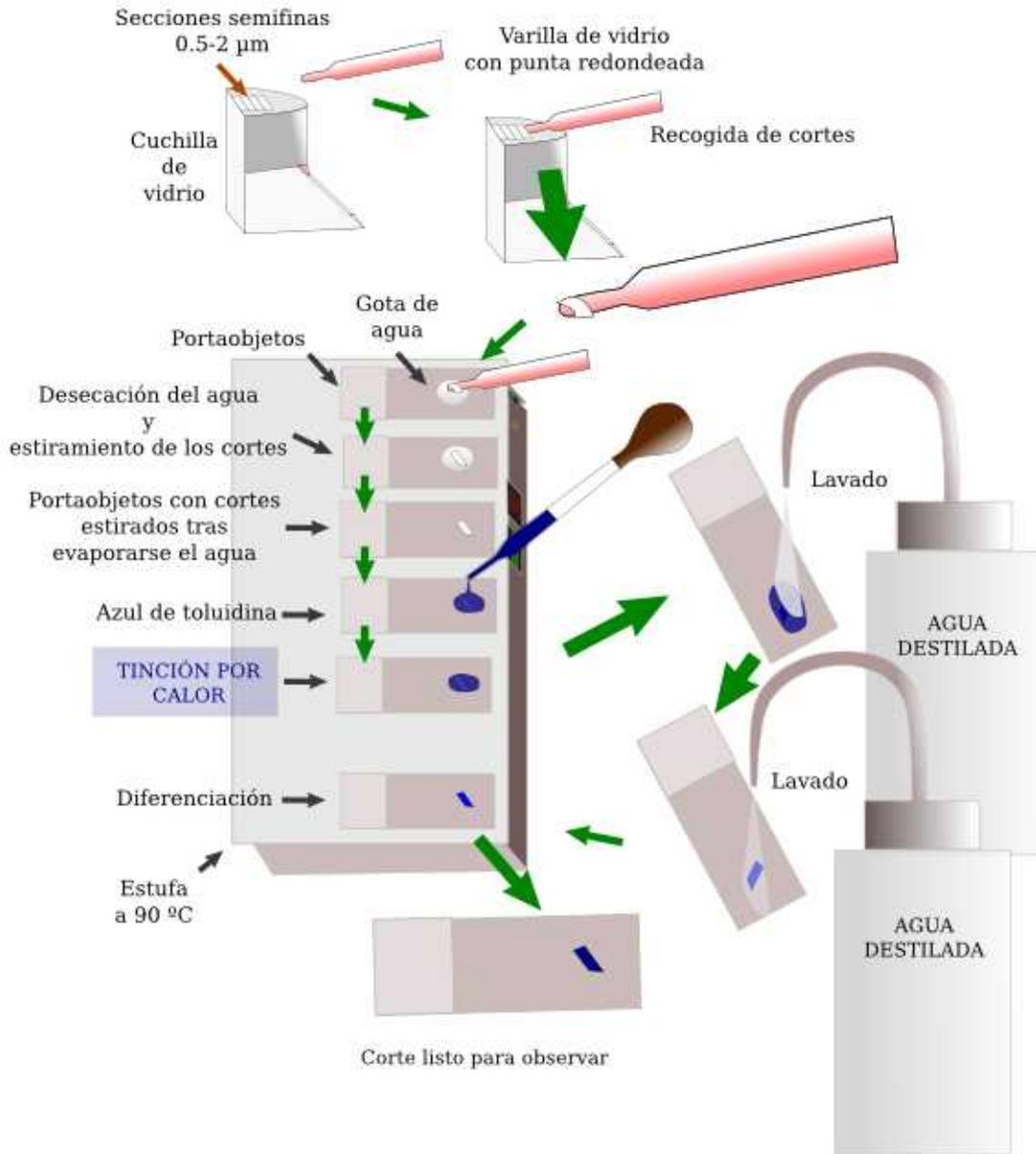


Figura 3.- Resumen de los pasos que se siguen en la preparación de una rejilla con cortes ultrafinos y el proceso de contraste para su observación al TEM



Fuentes de Información

1. Aballe, M., J. López Ruiz, J.M. Badía y P. Adeva (coordinadores). 1996. Microscopía electrónica de barrido y microanálisis de rayos X. CSIC, Ed. Rueda.
2. Goldstein, J.I., D.E. Newbury, P. Echlin, D.C. Joy, A.D. Romig, Jr., C.E. Lyman, C. Fiori and E. Lifshin. 1992. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: a text for biologist, materials scientists, and geologist. 2nd. ed.
3. Molhave, K. (ed.). *Opensource Handbook of Nanoscience and Nanotechnology*. Wikibooks (on line source): <http://en.wikibooks.org/wiki/Nanotechnology> (Consultado: 10/09/2009)

4. [Virtual Microscopy](#). Imaging Technology Group. Beckman Institute for Advance Science and Technology. University of Illinois
5. [Modern Microscopy Technique Resource](#) del [Center for Advanced Ultrastructural Research](#) of the University of Georgia
6. [Virtual Classroom Biology: imaging techniques](#) de la [Faculty of Science, Mathematics and Computing Science](#) de la [Radboud University of Nijmegen](#).
7. [Division of Human Patology](#) del [Department of Physiology](#) de la [Michigan State University](#)
8. [Molist, P., Pombal, MA. y Megías, M. 2009. Atlas de Histología Vegetal y Animal \(On line\). Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Vigo.](#)

Créditos de las figuras

- El logo del encabezamiento procede de la página web <http://ocw.um.es/>
- Las figuras de la lámina 1 y la B de la lámina 2 ha sido obtenida de la presentación de J.P. Shield “[SEM sample preparation](#)” de la página [Modern Microscopy Technique Resource](#) del [Center for Advanced Ultrastructural Research](#) of the University of Georgia.
- La figura A de la lámina 2 ha sido obtenida de la página [Electron Microscopy Sciences](#). La fotografía se encuentra en la dirección: <http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/sem/holder.aspx>.
- La figura A de la lámina 3 han sido obtenidas de la página web de [ANAME](#). Las fotografías se encuentran en la dirección: <http://www.aname.es/modules/polaronsc7640/>.
- La figuras B de la lámina 3 es de K. Molhave del wikilibro “[Openource Handbook of Nanoscience and Nanotechnology](#)” y ha sido obtenidas de la página [Wikimedia Commons](#). La fotografía se encuentran en la dirección: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DCplasmaSputtering.jpg>
- La figura C de la lámina 3 es de “GcG(jawp)” y ha sido obtenida de la página [Wikimedia Commons](#). La fotografía se encuentra en la dirección: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Au_sputtering_light.JPG.
- Las figuras A, D y E de la lámina 4 han sido obtenidas de la presentación de J.P. Shield “[Biological sample preparation](#)” de la página [Modern Microscopy Technique Resource](#) del [Center for Advanced Ultrastructural Research](#) of the University of Georgia.
- Las figuras B, C y F de la lámina 4 han sido obtenidas de la página web [Virtual Classroom Biology: imaging techniques](#) de la [Faculty of Science, Mathematics and Computing Science](#) de la [Radboud University of Nijmegen](#).
- Las figuras A, E y F de la lámina 5 han sido obtenidas de la presentación de J.P. Shield “[Biological sample preparation](#)” de la página [Modern Microscopy Technique Resource](#) del [Center for Advanced Ultrastructural Research](#) of the University of Georgia.
- Las figuras B y C de la lámina 5 han sido obtenidas de la página web [Virtual Classroom Biology: imaging techniques](#) de la [Faculty of Science, Mathematics and Computing Science](#) de la [Radboud University of Nijmegen](#).
- La figura D de la lámina 5 se ha adaptado de las fotografías de la página web de la [Division of Human Patology](#) del [Department of Physiology](#) de la [Michigan State University](#) y del catálogo de la empresa [Grid-Tech](#). La primera fotografía se encuentra en la dirección: <http://www.humanpathology.msu.edu/electronmicro/gallery/>.
- La figura G de la lámina 5 ha sido obtenida de la página web de la [Division of Human Patology](#) del [Department of Physiology](#) de la [Michigan State University](#). La fotografía se encuentra en la dirección: <http://www.humanpathology.msu.edu/electronmicro/gallery/>.
- Los esquemas de las Figuras 1, 2 y 3 se han obtenido de Molist, P., Pombal, MA. y Megías, M. 2009. [Atlas de Histología Vegetal y Animal \(On line\)](#). Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Vigo. Los esquemas se encuentran en las direcciones: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/3-resina.php> y <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/5-general.php>



**Técnicas de microscopía
aplicadas a las Ciencias Forenses**

Prof. Nicolás Ubero Pascal
Dpto. de Zoología y Antropología Física
Curso 2008-2009