

CURSO TEÓRICO PRÁTICO DE TÉCNICAS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Apostila elaborada por:
Prof. Dr. Eduardo Gross
Téc. MSc. Marcel Pires
Téc. Valéria Fernandes

Ilhéus, Bahia
Março de 2014

1. Introdução

O microscópio eletrônico fornece informações analíticas juntamente com a observação da ultraestrutura ou morfologia do objeto em estudo. De maneira geral, o microscópio eletrônico de transmissão (MET) funciona como um microscópio fotônico (de luz), enquanto que o microscópio eletrônico de varredura (MEV) funciona como um estereomicroscópio (lupa), entretanto, com maior poder de resolução. 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. A comparação deste valor com o comprimento de onda da luz visível (0,5 mm ou 500 nm) demonstra que um feixe eletrônico é cerca de 100.000 vezes menor, e considerando apenas este fator, teríamos um aumento correspondente no poder resolvente.

2. Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET)

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

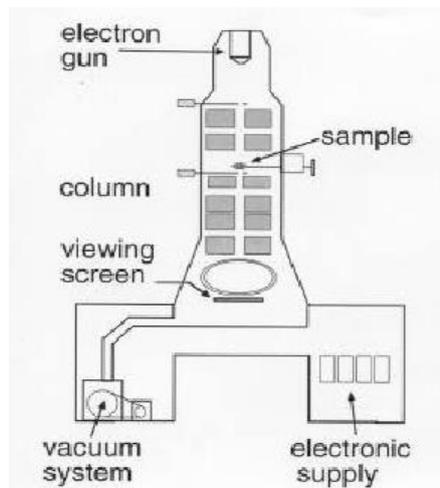


Figura 1. Representação esquemática de um MET (Duvert et al., 2003).

Um MET moderno possui cinco ou seis lentes magnéticas, além de várias bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas localizadas ao longo do caminho do feixe eletrônico. Entre estes componentes, destacam-se os três seguintes pela sua importância com respeito aos fenômenos de difração eletrônica: lente objetiva, abertura objetiva e abertura seletiva de difração. A função das lentes projetoras é apenas a produção de um feixe paralelo e de suficiente intensidade incidente na superfície da amostra. Na prática, o intervalo de aumentos do MET varia de 1.000 a cerca de 380.000 vezes.

No MET, a imagem do espécime é formada simultaneamente à passagem do feixe de luz através dele. Os elétrons saem da amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção

controladas pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Em seguida, a lente objetiva entra em ação, formando a primeira imagem desta distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados. Após este processo, as lentes restantes servem para aumentar a imagem ou diagrama de difração para futura observação. Deve-se, finalmente, destacar que embora existam em operação alguns aparelhos cuja tensão de aceleração é de 1.000 kV, a maioria dos equipamentos utilizados no estudo de materiais (metálicos, cerâmicos e poliméricos) dispõe de tensão de aceleração de até 200 kV. Os MET utilizados em biologia, em geral, operam na faixa de 60 a 80 kV.

3. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) surgiu comercialmente em 1965 e desde então tornou-se indispensável em muitos tipos de pesquisa biológica, contribuindo para a classificação e taxonomia de insetos e fungos, estudo da morfologia de grãos de pólen e em pesquisas de superfícies de diversas estruturas de plantas e animais. No MEV a imagem é formada através de um feixe de elétrons que é usado para varrer o espécime, o qual emite os chamados elétrons secundários (interação de um feixe primário com a superfície de interesse). O canhão e as lentes eletrônicas constituem os componentes essenciais do microscópio eletrônico. A imagem final é projetada em uma tela para observação. O feixe de elétrons é produzido em vácuo para evitar colisão com moléculas do ar. Para espécimes bem preparados (bons condutores) é vantajoso trabalhar-se com feixe primário de elétrons acelerados com 20 e 25 kV, pois ganha-se na resolução. Espécimes mais sensíveis podem precisar de elétrons menos energéticos. Também importante corrigir o astigmatismo da imagem e escolher adequadamente a distância de trabalho. Distâncias curtas favorecem melhor resolução, com certo sacrifício da profundidade de foco. O inverso, maiores distâncias de trabalho são necessárias para se fotografar com pequeno aumento, áreas e volumes grandes, garantindo boa profundidade de foco.

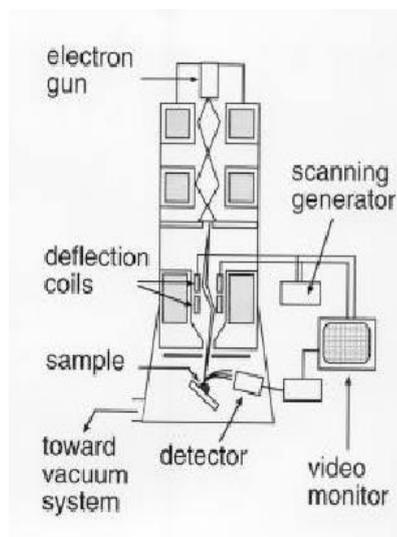


Figura 2. Representação esquemática de um MEV (Duvert et al., 2003).

4. Preparo de amostras para MET e MEV

O texto que segue é um breve resumo sobre os passos básicos de processamento de amostras para a microscopia eletrônica de transmissão e varredura. São aqui descritas as etapas de fixação, pós-fixação e desidratação, bem como a importância das soluções tampão no preparo de amostra para microscopia eletrônica. As particularidades do processamento para cada tipo de microscópio eletrônico serão descritas em seguida.

4.1 Fixação

Processo pelo qual se obtém estabilização das estruturas celulares e intercelulares. Idealmente, a morfologia dos diferentes tipos de biomacromoléculas, suas relações topológicas, bem como da fase aquosa com os respectivos solutos devem ser preservados como na situação *in vivo*. Entretanto, qualquer processo de fixação inevitavelmente introduzirá perturbações no sistema provocando o aparecimento de artefatos.

4.1.1 Fixação por Métodos Físicos:

a) Secagem ao ar: este procedimento induz grandes distorções nos componentes submicroscópicos dos tecidos, pois a evaporação da água provoca o colapso e desarranjo das estruturas subcelulares, devido à tensão superficial. Alguns organismos (p. ex., insetos) podem ser visualizados diretamente ao microscópio eletrônico e portanto submetidos ao "vácuo" (da ordem de 10^{-4} a 10^{-5} torr) da coluna do microscópio eletrônico, pois não exibem deformações nas suas estruturas.

b) Criofixação: fundamenta-se no fato de que submetendo as células a congelamento rápido e super-rápido (velocidade de 1000°C/s) a água intracelular e pericelular passa do estado líquido para o sólido formando cristais de gelo diminutos. Denomina-se vitrificação o procedimento em que há passagem direta da água do estado líquido para o sólido sem passar pelo estado de rede de cristal de gelo. Quando a velocidade de congelamento é baixa (-1°C/min) ocasiona na amostra a perda de água pelo efeito osmótico e a célula apresentará deformações ficando enrugada e distorcida.

As substâncias crioprotetoras têm a capacidade de se ligar à água intra e/ou extracelular, tornando-a não disponível para a formação de cristais de gelo se houver congelamento. O glicerol (ou glicerina), o dimetilsulfóxido e a sacarose na concentração de 2,0-2,3 M têm ação crioprotetora.

c) Criofixação convencional: o procedimento convencional para criofratura consiste em fixação química inicial com glutaraldeído e paraformaldeído. Em seguida, o fragmento de material é impregnado com concentrações crescentes de glicerol até a concentração final de 30% (vol./vol.).

Fragmentos com dimensões de, por exemplo, 0,3 x 0,3 x 0,5 mm são colocados em suporte de ouro-irídio e imersos na fase liquefeita de Freon 22 (-150°C) em nitrogênio líquido.

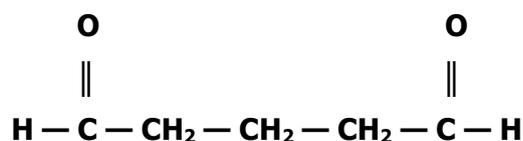
d) Criofixação por congelamento ultra-rápido ("Quick-freezing"): é obtido com o emprego de hélio líquido (-271°C ou 2°K). O fragmento de órgão ou tecido, com as células ainda vivas, é preso na parte central de um suporte especial de forma discóide que está na extremidade de uma haste que, por sua vez, deslizará em queda com velocidade controlada (2 m/s) sobre uma superfície resfriada com hélio líquido (-253°C ou 20°K), batendo contra uma superfície resfriada de cobre. O congelamento ultra-rápido pode-se obter bons resultados para células em tecidos frescos não fixados quimicamente, entretanto somente a uma profundidade de 10 a 30 µm da superfície de impacto.

4.1.2 Fixação por Métodos Químicos

É obtida pelo emprego de substâncias que, reagindo com determinados sítios das biomacromoléculas, estabilizam as mesmas. As moléculas das substâncias empregadas na fixação podem ou não ser adicionadas às macromoléculas dos tecidos. Os fixadores químicos podem desnaturar as proteínas em graus variáveis, conforme a estrutura molecular do agente fixador. Os fixadores que têm ação coagulantes sobre as proteínas (p. ex., etanol) alteram a configuração das mesmas (por isso não são utilizadas em microscopia eletrônica) e, geralmente, não são incorporadas às proteínas sendo por isso também referidos como não aditivos.

Sob a ação dos fixadores não coagulantes, como os aldeídos fórmico e glutárico, a acroleína e o tetróxido de ósmio, as proteínas assumem o aspecto de um gel transparente, isso porque ocorre estabilização estrutural através de uma amarração que as moléculas fixadoras fazem sobre as macromoléculas tissulares sem distorcer muito estas últimas (aqui ocorre ligações cruzadas entre os componentes estruturais; por isso os fixadores capazes de manter estas ligações são denominados de aditivos). Um efeito importante dessa fixação é que a mesma pode tornar não coaguláveis proteínas coaguláveis pelos fixadores que têm ação coagulante. Assim, após a fixação pelo aldeído glutárico as proteínas não são mais coaguláveis pelo etanol ou a acetona utilizados na desidratação.

a) Dialdeído glutárico (aldeído glutárico – AG ou Glutaraldeído): é a substância mais utilizada como fixador em microscopia eletrônica. Tem fórmula estrutural:



É fornecido em soluções aquosas de concentrações entre 25 e 70% com pH entre 4,0 e 5,0. Soluções estoques de AG com pH inferior a 3,5 devem ser descartadas, pois terão má ação fixadora. O AG é um fixador aditivo, à medida que penetra vai sendo irreversivelmente incorporado às estruturas. Além disso, em cada sítio reativo para fixação serão consumidas em média várias moléculas do fixador. Portanto deve-se prover excesso de moléculas fixadoras. Com as concentrações de aldeído glutárico entre 1,5 e 2,0% temos como norma prática que o volume total dos fragmentos a serem fixados não devem exceder a 1/20 do volume da solução fixadora.

Vale ressaltar que: a) a ação desnaturante do AG sobre as proteínas é pequena, portanto o AG altera relativamente pouco a configuração terciária das cadeias polipeptídicas; b) a estrutura em hélice dessas cadeias é substancialmente reduzida, mas não abolida; e c) várias moléculas de AG participam das ligações cruzadas intra e intermoleculares.

b) Formaldeído (CH₂): as soluções comerciais designadas de formalina têm concentrações de formaldeído de 37-40%. A formalina apresenta de 11-16% de metanol que extrai o citoplasma das células. Preservação razoável de material é obtida se a amostra for fixada em formalina 10% (ou de formaldeído 3,7-4,0%) em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2-7,4) e depois em tetróxido de ósmio. Para se obter formaldeído livre de metanol parte-se da forma polimérica do formaldeído que é o paraformaldeído.

c) Paraformaldeído (CH₂O)_n ou trioximetileno: é um pó solúvel em meio aquoso ligeiramente alcalino. A solução de formaldeído preparada a partir do paraformaldeído deve ser feita extemporaneamente em capela. O formaldeído preserva menos a estrutura celular que o AG ou a acroleína por ser menos eficiente que estes em estabelecer ligações cruzadas, entretanto é bastante empregado para estudos de imunocitoquímica. O formaldeído é um dos piores fixadores de lipídios, entretanto a fixação de certas proteínas tissulares é muito semelhante à obtida pelo AG.

d) FAA (formaldeído, ácido acético e álcool etílico): este fixador é mais comumente utilizado em estudos anatômicos de microscopia óptica. Entretanto, pode ser utilizado para MEV. Alguns autores afirmam que o FAA deve ser feito na hora de usar. A desidratação deve começar num grau próximo ao do fixador. O FAA tem diversas fórmulas (ver Kraus & Arduin, 1997). O FAA₇₀ tem a seguinte fórmula: 50 ml de ácido acético glacial, 50 ml de formaldeído (a 37%) e 900 ml de álcool etílico. O grau alcoólico dessa fórmula é de 63%.

CONDUTA PARA UMA BOA FIXAÇÃO

Os fatores que afetam a velocidade de penetração dos fixadores nos diferentes tecidos de um órgão são vários e dependem das características físico-químicas da molécula do fixador, da concentração desta, da temperatura de fixação e da textura do órgão a ser fixado. A velocidade de penetração do glutaraldeído, por exemplo, é da mesma ordem de grandeza daquela do tetróxido de ósmio (0,2-0,6 mm/hora), podendo conforme o órgão ser ou ligeiramente superior ou ligeiramente inferior. O formaldeído penetra cerca de 5 a 10 vezes mais rapidamente que qualquer dos dois fixadores citados. É importante considerar ainda a velocidade de reação do fixador com as biomacromoléculas.

a) Fixação por imersão: é o meio mais utilizado para fixar órgãos e tecidos, principalmente os mais superficiais. É pré-requisito do método que o fragmento de órgão ou tecido a ser fixado seja imerso no fixador imediatamente após a sua retirada do organismo. O fragmento deve ter idealmente de 1,0-0,5 mm em sua maior dimensão.

b) Fixação por perfusão: é o procedimento que propicia fixação de qualidade superior pois imediatamente coloca o fixador ao nível pericelular e celular. Os fatores a serem cuidadosamente considerados neste tipo de fixação são: composição iônica, osmolaridade efetiva, temperatura da solução fixadora e pH do órgão em estudo.

c) Osmolaridade: uma solução é isosmótica em relação a uma determinada categoria celular se a pressão osmótica da célula e da solução forem iguais. A solução será isotônica se as células não exibirem modificação de volume quando mantidas na solução. Osmolaridade é a molaridade (expressa em moles/L) de uma solução ideal de substância absolutamente não ionizável à qual corresponde uma dada pressão osmótica. Os tampões fosfato e cacodilato nas concentrações 0,1 M são hipotônicos. O glutaraldeído parece exercer algum efeito osmótico sobre as células, porém sua contribuição para a pressão osmótica efetiva da solução é bem menor que a pressão osmótica do tampão.

4.2 Pós-Fixação

Tetróxido de Ósmio (OsO_4): o OsO_4 protege as lipoproteínas naturais dos tecidos evitando sua ruptura e coagulação. Em relação às proteínas, a ação do tetróxido de ósmio ainda é pouco conhecida. O ósmio estabiliza e contrasta especialmente os fosfolípidios constituintes da membrana citoplasmática. Atua sobre os ácidos graxos insaturados (com dupla ligação) desses fosfolípidios. Este fixador tem um papel importante na contrastação inicial da amostra, não devendo a exposição dos tecidos ser muito prolongada. O OsO_4 é altamente cancerígeno, devendo ser manipulado com todos os equipamentos de proteção necessários, como capela de exaustão, luvas e máscara.

4.3 Soluções Tampão

Um dos requerimentos básicos para uma boa fixação de amostras de material biológico para microscopia eletrônica é a manutenção do pH das soluções fixadoras. Sabe-se que tecidos fixados em soluções fixadoras não tamponadas sofrem profundas alterações, uma vez que a acidificação da amostra precede sua fixação. Esta acidificação é responsável por modificações na estrutura de proteínas. Através do tamponamento de soluções fixadoras a acidificação pode ser neutralizada ou progredir mais lentamente, diminuindo assim o dano sobre a amostra processada. Soluções tampão contém ácidos ou bases fracas, com seus respectivos sais resistindo a variações na concentração de íons hidrogênio, garantindo desta maneira que durante o tempo de fixação o pH da solução fixadora sofra apenas pequenas alterações.

A eficiência do sistema tampão varia de acordo com o pH. Para evitar que o tampão caia em uma faixa não tamponante, deve-se medir a temperatura e o pH da solução fixadora no momento da fixação. A capacidade tamponante de uma solução tampão é também dependente da concentração do soluto, da natureza do material celular e do tipo de fixador usado, uma vez que alguns fixadores podem reagir com os componentes da solução tampão. Os tampões fosfato e cacodilato $[\text{Na}(\text{CH}_3)\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ são os mais largamente empregados. O tampão fosfato tem propiciado ótimos resultados de fixação quando utilizado tanto na fixação primária com aldeído como na fixação secundária com tetróxido de ósmio. Se a ótima qualidade de fixação que promove não é superior à obtida com cacodilato, certamente não é inferior a esta, tendo as vantagens de ser mais fisiológico, não tóxico para célula em cultivo e apresentando ação fixadora.

Os tampões com cacodilato por conterem arsênio devem ser manipulados em capelas. Porém, quando for necessário utilizar cloreto de cálcio (CaCl_2) na solução fixadora, deve-se utilizar o tampão cacodilato. O fosfato precipita na presença de cálcio sobre a forma de fosfato de cálcio.

Para que um tampão seja considerado um "bom tampão", ele deve satisfazer as seguintes exigências: a) pKa entre 6,0 e 8,0, uma vez que a maioria das funções biológicas ocorrem dentro desta faixa de pH; b) solubilidade máxima em água e mínima em outros solventes; c) penetração reduzida em membranas biológicas; d) efeito reduzido com íons para que alguns possam ser introduzidos na solução fixadora final; e) ausência de aminas primárias que possam reagir com o glutaraldeído interferindo assim com a fixação; f) pouca dissociação do tampão em relação à temperatura, concentração e composição iônica; g) resistência à oxidação; h) que seja de fácil preparo.

a) Tampão Cacodilato: seu pH de tamponamento máximo se encontra na faixa de 6,4 a 7,4 e oferece vantagens na fixação de materiais biológicos: ausência de íons fosfato que possam interferir em estudos citoquímicos; preservação da atividade de determinadas enzimas; resistência à contaminação por bactérias; e possibilidade de adição de cálcio às soluções fixadoras.

b) Tampão Fosfato: de todos, é considerado o tampão mais fisiológico porque é encontrado em células na forma de fosfatos inorgânicos e éster de fosfato. O pH de tampões fosfato apresenta pouca variação em diferentes temperaturas. Este tampão não é recomendado para citoquímica de enzimas e não pode ser suplementado com sais de cálcio ou urânio, pois pode resultar em precipitação de compostos.

4.4 Desidratação

Antes de realizar as etapas de ponto crítico durante o processamento para o MEV e de inclusão em resina para o MET é necessário retirar toda a água do sistema biológico, o que deve ser feito de maneira gradual. Modificações bruscas podem levar ao colapamento das finas projeções citoplasmáticas, afetando a estrutura celular. Após a fixação, o material deve ser bem lavado, com tampão caso o fixador seja tamponado ou com água caso não o seja, iniciando-se em seguida a desidratação com banhos sucessivos de concentrações crescentes de um agente adequado que substitua a água e a elimine do espécime. Os agentes desidratantes mais usados são o etanol e a acetona.

5. Particularidades do processamento de amostras para MET

5.1. Embebição e Inclusão

Após a desidratação, o espécime a ser analisado em MET deve ser incluído em um material que permita a posterior obtenção de cortes ultrafinos. Este material deve apresentar boa estabilidade quando submetido ao feixe eletrônico e permitir uma contrastação adequada. Várias substâncias são utilizadas como agentes de inclusão, sendo as resinas as mais conhecidas.

Praticamente todas as resinas utilizadas na microscopia eletrônica são suspeitas de serem cancerígenas, devendo, portanto, ser manipuladas com todos os equipamentos de proteção necessários, como capela de exaustão, luvas e máscara. As resinas são comercializadas em 'kits', contendo os componentes e as proporções de preparo dos reagentes. Antes de levar à estufa para a polimerização, os espécimes infiltrados devem ser colocados em cápsulas de gelatina ou em moldes flexíveis, devidamente identificados. As principais resinas utilizadas são a Epon, a Spurr e a LR White.

5.2. Ultramicrotomia

O conhecimento da ultraestrutura celular só avançou quando se tornou possível efetuar cortes ultrafinos de material biológico, com espessura entre 10 e 100nm. Para conseguí-los foi necessário o desenvolvimento do ultramicrótomo, providos de navalhas de fio mais uniforme e agudo do que as de aço utilizadas até então, e feitas de vidro, safira ou diamante. A espessura dos cortes ultrafinos é avaliada pela cor que apresentam quando flutuam na superfície da água na cuba coletora ('barcas'). As cores cinza, prateada, dourada e avermelhada correspondem, respectivamente, às espessuras de 60, 60-90, 90-150 e 150-190 nm.

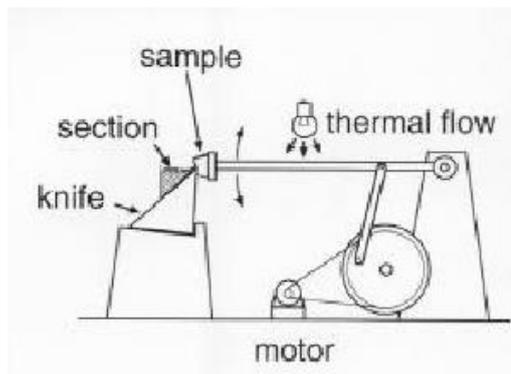


Figura 4. Representação esquemática de um ultramicrótomo (Duvert et al., 2003).

As navalhas de vidro são de fácil confecção, a partir de uma barra de vidro de 25 mm de largura por 6 mm de espessura. Porém, são frágeis, necessitando substituição freqüente. A qualidade do vidro é importante para a obtenção de boas navalhas. As barras são quebradas com auxílio de uma máquina especialmente desenvolvida com este fim (Knifemaker, Reichert). As navalhas de vidro devem apresentar o gume mais reto possível, às vezes com um pequeno esporão de um lado, mas livre, na sua maior parte, de imperfeições da fratura, como um fino serrilhado, usando-se somente o trecho melhor, longe do esporão mas não muito próximo ao outro lado. As 'barcas' coletoras de cortes ultrafinos são afixadas às navalhas, através de esmalte ou fita adesiva.

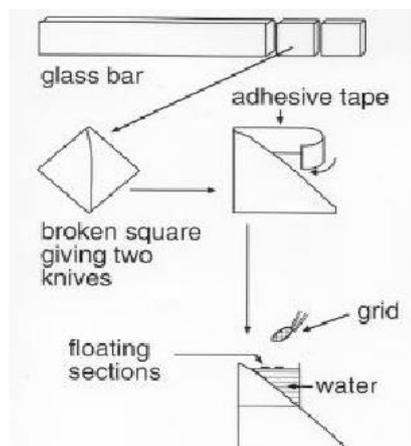


Figura 5. Representação esquemática da confecção de uma navalha de vidro (Duvert et al., 2003).

As navalhas de diamantes são muito resistentes e duráveis, mas deve-se tomar cuidado para evitar qualquer movimento transversal ao gume. Desde que não cortem materiais que contenham inclusões muito duras, uma navalha de diamante bem tratada pode durar vários anos em boas condições. Para se evitar defeitos nos cortes, deve se manter a navalha perfeita, limpa e sem dente, e obter blocos homogêneos, de consistência adequada e material bem infiltrado.

Os cortes são coletados na água e posicionados sobre uma grade, em geral de cobre, podendo ser de níquel ou ouro (utilizadas em citoquímica e histoquímica). Há grades com aberturas de diferentes formatos, mais comumente quadrados ou hexagonais.

5.3. Contrastação

Para intensificar o contraste dos cortes ultrafinos, as grades são colocadas sobre uma gota de acetato de uranila 5% em água destilada durante 5-30 minutos, com o corte voltado para a gota. Esta é previamente depositada sobre um pedaço de parafilme no fundo de uma placa de Petri, devidamente protegida da poeira ambiente. Em seguida, deve-se lavar a grade em água destilada. O excesso de água é absorvido com um pedaço de papel filtro, podendo-se então colocar a grade sobre uma gota de citrato de chumbo durante 5-30 minutos, lavando-se e secando-se como descrito anteriormente. Após a contrastação, o corte está pronto para ser examinado com o MET.

6. Particularidades do processamento de amostras para MEV

6.1. Ponto Crítico

A secagem final da amostra para observação no MEV será feita sobre condições tais que por ela não passe um menisco de transição de fases evitando as forças resultantes da tensão superficial. Isto é obtido na câmara de ponto crítico (em inglês CPD-Critical Point Dryer, no caso um BalTec CPD 030), geralmente utilizando-se dióxido de carbono como agente de troca. Sabe-se que para cada fluido, existe uma condição de temperatura e pressão característica, em que as fases líquida e gasosa do fluido não podem co-existir; esta combinação corresponde ao ponto crítico do fluido.

Para se fazer o ponto crítico, leva-se a amostra já fixada e completamente desidratada, à câmara de CPD, em um pequeno volume de acetona. Com a câmara isolada injeta-se o CO₂ líquido, e para isso a câmara deve estar à 4-5°C, fazendo-se várias substituições até remoção total da acetona. Com o posterior aquecimento controlado da câmara o CO₂ torna-se gasoso a uma determinada pressão sem que se forme o menisco de transição e sem que exista a modificação na estrutura do material biológico.

6.2. Montagem e Metalização

O espécime seco precisa ser montado de modo adequado no suporte porta-amostras do MEV ("stub"), ajustando-se a melhor orientação em relação ao feixe de elétrons e ao coletor. Vários tipos de adesivos podem ser usados: cola de prata coloidal, fitas adesivas dupla face, esmalte de unha contendo carbono coloidal, dentre outros. A escolha dependerá das características da amostra.

Depois da montagem o próximo passo a ser dado é a cobertura da amostra com metal. Este passo visa prover ou aumentar a condutividade da superfície da amostra através de uma fina camada (com até 20-30 nm de espessura) de metal, de preferência, ouro ou ouro-paládio. O processo mais eficaz de deposição é através de um sistema de evaporação conhecido como "sputtering". Neste sistema, o ouro é removido de um eletrodo maciço, por bombardeamento com íons pesados de argônio, e se deposita sobre todas as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. Embora seja possível usar evaporação térmica em alto vácuo, o sistema de "sputtering" é mais eficiente. Além de ouro, alguns materiais podem necessitar de uma cobertura adicional com carbono, obtida no evaporador convencional de alto vácuo. Após a metalização, a amostra está pronta para ser examinada com o MEV.

7. Referências Bibliográficas

- DUVERT, M.; THIÉBAUD, P.; VERNA, A.; VERNAY, J-L. & THÉZÉ, N. 2003. Training of students in microscopy studies of normal and pathological structures: a practical course. In: ROSEI, W. *Science Technology and Education of Microscopy: An Overview*. Madrid: FORMATEX, 2003. v. 1, p. 802-816.
- FARINA, M. Fundamentos de Microscopia Analítica para Biólogos. In: SOUZA, W. *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica aplicada às Ciências Biológicas*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.
- GALLETI, S.R. 2003. Introdução a Microscopia Eletrônica. *Biológico*, v. 65, p. 33-35.
- GRIMSTONE, A. V. 1980. *O Microscópio Eletrônico em Biologia*. [tradução Marina Silveira]. EPU: Editora da Universidade de São Paulo. Coleção Temas de Biologia. Volume 11. São Paulo - SP.
- GRIZZI, F.; FRANCESCHINI, B.; CHIRIVA-INTERNATI, M.; HERMONAT, P.; SHAH, G.; MUZZIO, P. & DIOGUARD, N. 2003. The Complexity and the Microscopy in the Anatomical Sciences. In: ROSEI, W. *Science Technology and Education of Microscopy: An Overview*. Madrid: FORMATEX, 2003. v. 1, p. 396-404.
- MACHADO, R. D. & SOUZA, W. Desidratação, Inclusão, Ultramicrotomia e Contrastação. In: SOUZA, W. *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica aplicada às Ciências Biológicas*. Rio de Janeiro : Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.
- PADRON, T. S. Soluções Tampão. In: SOUZA, W. *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica aplicada às Ciências Biológicas*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.
- SESSO, A. Fixação de Sistemas Biológicos. In: SOUZA, W. *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica aplicada às Ciências Biológicas*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

SILVEIRA, M. Preparo de Amostras Biológicas para Microscopia Eletrônica de Varredura. In: SOUZA, W. *Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica aplicada às Ciências Biológicas*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

SOUZA, W. Manual sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica . Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1993, v.III.

Alguns *websites* de interesse:

<http://potency.berkeley.edu/cpdb.html>

<http://stainsfile.info/StainsFile/index.html>

<http://hazard.com/>

<http://msds.ehs.cornell.edu/msdssrch.asp>

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e03/03e.htm>

http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_index.htm

<http://fap01.if.usp.br/~lff/mev.html>

ANEXOS

1. PROTOCOLO PARA PROCESSAMENTO DE TECIDO ANIMAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Fixação em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,1-7,2) – 2 horas, à temperatura ambiente.

Obs: caso necessário, conservar as amostras em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,1-7,2).

Lavar o material em tampão cacodilato de sódio (3x) – 5 minutos cada.

Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% – 1 hora, à temperatura ambiente.

Lavar o material em tampão cacodilato de sódio (3x) – 5 minutos cada.

Desidratação – série crescente de acetona:

- Acetona 70% – 10 minutos, à temperatura ambiente;
- Acetona 80% – 10 minutos, à temperatura ambiente;
- Acetona 90% – 10 minutos, à temperatura ambiente;
- Acetona 95% – 10 minutos, à temperatura ambiente;
- Acetona 100% (3x) – 10 minutos cada, à temperatura ambiente.

Obs: no caso de usar o Etanol no lugar da acetona, a última troca deve ser com óxido de propileno. Etanol não é miscível com EPON. Dar preferência para desidratar com acetona.

Infiltração – resina EPON-812:

- EPON-812 + Acetona 100% (proporção 1:2) – 1 hora;
- EPON-812 + Acetona 100% (proporção 1:1) – 1 hora;
- EPON-812 + Acetona 100% (proporção 2:1) – *overnight*;
- EPON-812 pura – 30 minutos.

Emblocar em formas apropriadas, devidamente identificadas.

Polimerização em estufa a 60°C – 24 horas.

Ultramicrotomia – cortes em navalha de vidro ou diamante, com espessuras em torno de 60-70 nm.

Contrastação:

- Acetato de Uranila 2% – 20-30 minutos;
- Citrato de Chumbo – 5 minutos;
- Lavar em água destilada e secar com papel filtro.

2. PROTOCOLO PARA PROCESSAMENTO DE TECIDO VEGETAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Fixação em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2) – 1-4 horas.

Obs: caso necessário, conservar as amostras em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2).

Lavar o material em tampão fosfato de sódio (2x) – 10 minutos cada.

Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% – 2 horas.

Lavar o material em tampão fosfato de sódio (2x) – 10 minutos cada.

Desidratação – série etanólica crescente:

- Etanol 60% – 10 minutos;
- Etanol 70% – 10 minutos;
- Etanol 80% – 10 minutos;
- Etanol 90% – 10 minutos;
- Etanol 95% – 10 minutos;
- Etanol 100% (2x) – 10 minutos cada.

Infiltração – resina LR White:

- LR White + Etanol 100% (proporção 1:2) – 2 horas;
- LR White + Etanol 100% (proporção 1:1) – 2 horas;
- LR White pura – *overnight*, trocar pela manhã, incluir à tarde.

Emblocar em cápsulas de gelatina devidamente identificadas, para evitar o contato com o ar, o que impede a polimerização.

Polimerização em estufa a 60°C – 48 horas.

Ultramicrotomia – cortes em navalha de vidro ou diamante, com espessuras em torno de 60-70 nm.

Contrastação:

- Acetato de Uranila 2% – 20-30 minutos;
- Citrato de Chumbo – 5 minutos;
- Lavar em água destilada e secar com papel filtro.

3. PROTOCOLO PARA PROCESSAMENTO DE HIFAS DE FUNGOS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Fixação em glutaraldeído 2,0% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2) – *overnight*, 4°C.

Lavar o material em água destilada (3x) – 10 minutos cada, à temperatura ambiente.

Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% – 45 minutos, à temperatura ambiente.

Obs: Cada lavagem corresponde a ressuspensão do material em água.

Lavar o material em água destilada até clarear o material.

Desidratação – série etanólica crescente:

- Etanol 30% – 10 minutos;
- Etanol 50% – 10 minutos;
- Etanol 70% – 10 minutos;
- Etanol 90% – 10 minutos;
- Etanol 95% – 10 minutos;
- Etanol 100% (3x) – 10 minutos cada.
- Óxido de propileno (2x) – 30 minutos cada.

Infiltração – resina EPON-812:

- EPON-812 + Óxido de propileno (proporção 1:2) – 1 hora;
- EPON-812 + Óxido de propileno (proporção 1:1) – 1 hora;
- EPON-812 + Óxido de propileno (proporção 2:1) – *overnight*;
- EPON-812 pura – 30 minutos.

Emblocar em formas apropriadas, devidamente identificadas.

Polimerização em estufa a 60°C – 24 horas.

Ultramicrotomia – cortes em navalha de vidro ou diamante, com espessuras em torno de 60-70 nm.

Contrastação:

- Acetato de Uranila 2% – 20-30 minutos;
- Citrato de Chumbo – 5 minutos;
- Lavar em água destilada e secar com papel filtro.

4. PROTOCOLO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Fixação de pequenos fragmentos da amostra (aproximadamente 3x3mm) em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio ou cacodilato de sódio 0,1M – 4 horas.

Lavar o material em tampão fosfato de sódio ou cacodilato de sódio 0,1M (3x) – 10 minutos cada.

Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio ou cacodilato de sódio 0,1M – 1 hora (opcional).

Lavar o material em tampão fosfato de sódio ou cacodilato de sódio 0,1M (3x) – 10 minutos cada.

Desidratação – série crescente de etanol ou acetona:

- Acetona ou Etanol 50% – 10 minutos;
- Acetona ou Etanol 60% – 10 minutos;
- Acetona ou Etanol 70% – 10 minutos;
- Acetona ou Etanol 80% – 10 minutos;
- Acetona ou Etanol 90% – 10 minutos;
- Acetona ou Etanol 100% (3x) – 10 minutos cada.

Ponto Crítico: o processo permite a retirada de toda água do tecido e dura cerca de 40 minutos na câmara de ponto crítico (em inglês CPD-Critical Point Dryer). Em seguida a amostra deve ser montada em "Stub" com fita dupla face de carbono.

Metalização: é depositada uma fina camada de ouro sobre a amostra com cerca de 20 a 30nm de espessura, através de um sistema de evaporação conhecido como "sputtering", utilizando o aparelho Sputter Coater SCD 050, BalTec.

Observação do material no Microscópio Eletrônico de Varredura.