



Novembro, 2002

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos93

Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura

Luis Antônio Suita de Castro

Pelotas, RS
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392 Km 78
Caixa Postal 403 - Pelotas, RS
Fone: (53) 275 8199
Fax: (53) 275 8219 - 275 8221
Home page: www.cpact.embrapa.br
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Mário Franklin da Cunha Gastal
Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia
Membros: Ariano Martins Magalhães Junior, Flávio Luiz Carpena Carvalho,
Darcy Bitencourt, Cláudio José da Silva Freire, Vera Allgayer Osório
Suplentes: Carlos Alberto Barbosa Medeiros e Eva Choer

Supervisor editorial: Maria Devanir Freitas Rodrigues
Revisoras de texto: Maria Devanir Freitas Rodrigues/Ana Luiza Barragana Viegas
Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Editoração eletrônica: Oscar Castro

1ª edição

1ª impressão (2002): 100

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Castro, Luis Antônio Suita de.
Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura / Luis Antônio
Suita de Castro. - Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001.
37p. - (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 93).

ISSN 1516-8840

1. Microscopia eletrônica - I. Título. II. Série.

CDD 578.0282

Autor

Luis Antônio Suita de Castro

Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Clima Temperado
Cx. Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas, RS.
e-mail: suita@cpact.embrapa.br

Apresentação

Desde 1997 a Embrapa Clima Temperado conta com a área de microscopia eletrônica. Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com relação à microscopia de varredura permitindo obter imagens em três dimensões, com ampliações de até 300 mil vezes.

Assim, disponibiliza-se o laboratório de microscopia eletrônica a diferentes áreas, desde a vegetal à humana.

Nesta publicação apresentamos resultados de algumas das atividades realizadas pela equipe que atua com esta tecnologia que, com certeza, beneficia produtores, técnicos, acadêmicos e demais interessados no segmento.

O objetivo do ***Documentos 93 Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura*** é oportunizar a prática de atividades direcionadas a esta área, a partir da descrição dos procedimentos básicos realizados neste centro de pesquisa.

Arione da Silva Pereira
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Sumário

Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura	9
Introdução	9
Etapas gerais do processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura	12
Coleta, seleção e limpeza	12
Estabilização da forma	12
Desidratação e secagem das amostras	13
Montagem e cobertura	13
Conservação das amostras	14
Condições de observação no MEV	15
Processamento geral para amostras de tecidos Animais e Vegetais	17
Processamento de fungos	17
Processamento de bactérias	18

1. Infecção externa em tecido animal ou vegetal	18
2. Infecção interna em tecido animal ou vegetal	18
3. Inoculadas em meio de cultura	18
Procedimento para visualização de estruturas de artrópodes e vermes	19
a) Artrópodes	19
b) Vermes	19
Processamento de amostras humanas	20
Processamento de materiais	20
Visualização de compostos orgânicos	20
Reconhecimento de artefatos.....	21
Resultados obtidos	22
Referências Bibliográficas	36
Agradecimentos	37

Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura

Luis Antônio Suita de Castro

Introdução

O mundo microscópico mostra-se fascinante quando observado de perto. A perfeição das formas, a maneira como estão estruturadas e a riqueza de detalhes impressionam até mesmo quem convive intimamente com esta realidade. Graças aos microscópios, este panorama pode ser colocado ao alcance de nossos olhos.

Sem ajuda, o olho humano tem um poder de resolução de 1/10 milímetro, ou 100 micrômetros. Isto significa que, se alguém olhar para duas linhas que estão separadas por menos de 100 micrômetros, elas parecerão ser uma só linha. Do mesmo modo, dois pontos que distam menos de 100 micrômetros um do outro parecerão um único ponto mal definido. Para que se possam distinguir estruturas que estejam mais próximas que este valor, é necessária a utilização de microscópios (Figura 1).

De acordo com Raven *et al.* (1996), os melhores microscópios ópticos têm um poder de resolução de 0,2 micrômetro, ou aproximadamente 200 nanômetros, e portanto, aumentam a resolução do olho nu em 500 vezes. É teoricamente impossível a construção de um microscópio óptico capaz de melhor resolução. O fator limitante é o comprimento de onda da luz, que varia de 0,4 micrômetro para a luz violeta até 0,7 micrômetro para a luz vermelha.

É importante notar que o poder de resolução e a ampliação são diferentes. Usando o melhor microscópio óptico, ao tirar uma fotografia de duas linhas que distam menos de 200 nanômetros, é possível aumentá-la indefinidamente. No entanto, estas linhas terão pouca definição. A utilização de lentes mais potentes permite que se obtenha um maior aumento, o que não implica em uma melhor resolução.

A resolução do microscópio eletrônico de varredura (Scanning Electron Microscope) é de 10 nanômetros, constituindo-se em uma ferramenta bastante importante em atividades de pesquisas (Tabela 1). As aplicações do microscópio eletrônico de varredura (MEV) incluem desde estudo de organismos inteiros, tecidos e órgãos, até em certos casos, visualização *in situ* de organelas subcelulares. O MEV usa elétrons que se dispersam ou são emitidos a partir da superfície da amostra. O feixe de elétrons é localizado dentro de uma pequena sonda que passa rapidamente para frente e para trás sobre a amostra. O rastreamento completo de cima abaixo geralmente leva apenas alguns segundos. As diferenças na superfície da amostra afetam o padrão com o qual os elétrons são dispersos a partir deste. Buracos ou fissuras aparecem escuros, as protuberâncias e saliências aparecem claras, resultando em uma imagem tridimensional. Somente estruturas superficiais podem ser examinadas com o MEV. Conseqüentemente, este é utilizado para estudar células inteiras, tecidos e superfícies de diversas estruturas.

O microscópio eletrônico de varredura é o mais versátil instrumento para avaliação, exame e análise das características microestruturais de amostras biológicas e não-biológicas. O interesse maior é obter informações topográficas. A grande vantagem deste instrumento é a elevada profundidade de campo, da ordem de 10 μm para aumentos de cerca de 10.000 X, chegando a 1 cm para aumentos de 20 X. Esta característica possibilita obter imagens estereoscópicas e bem enfocadas com espécimes até macroscópicos. Além disso, no MEV a amostra pode ser inclinada e rotacionada sob o feixe eletrônico em todas as orientações, logo precisa estar bem preservada nas três dimensões.

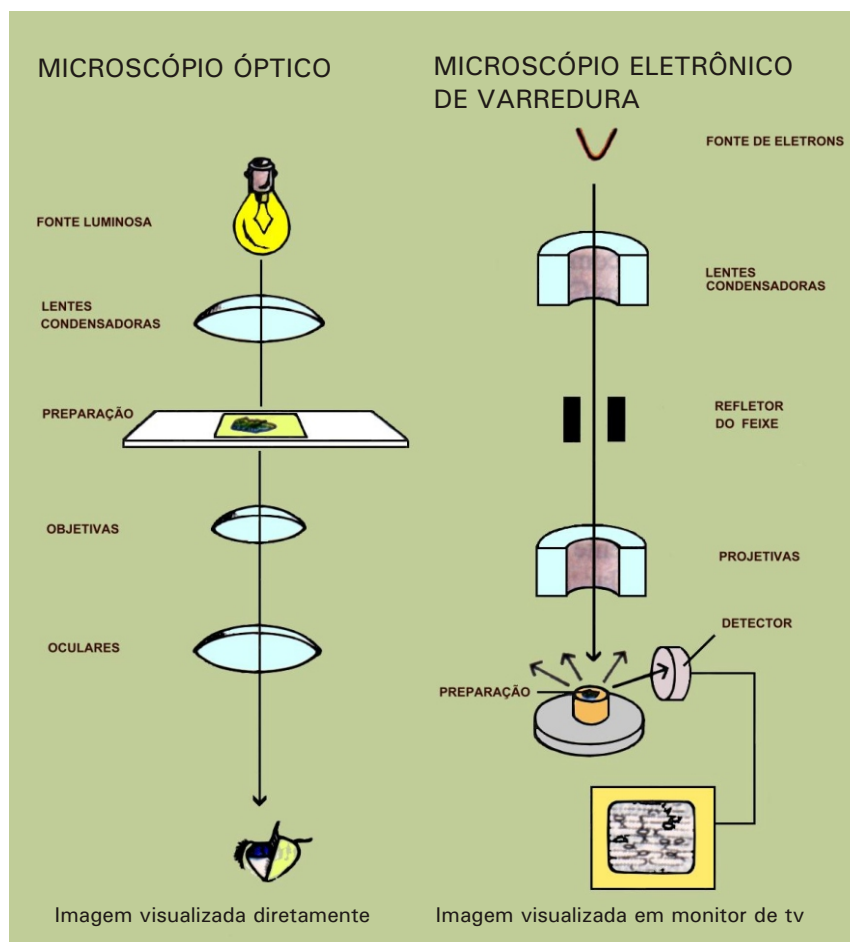


Figura 1. Esquema comparativo entre um microscópio óptico e um microscópio eletrônico de varredura (adaptado de Raven *et al.*, 1996).

Tabela 1. Equivalência das medidas usadas em microscopia.

Medidas usadas em microscopia		
1 centímetro (cm)	= 1/100 metro	= 0,4 polegada
1 milímetro (mm)	= 1/1.000 metro	= 1/10 cm
1 micrômetro (μm) *	= 1/1.000.000 metro	= 1/10.000 cm
1 nanômetro (nm) **	= 1/1.000.000.000 metro	= 1/10.000.000 cm
1 metro = 10^2 cm = 10^3 mm = 10^6 μm = 10^9 nm		

* Micrômetros eram antigamente conhecidos como mícrons (μ)

** Nanômetros eram conhecidos como milimícrons (μm)

Etapas gerais do processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura

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

Devido à condição natural hidratada, a amostra biológica apresenta relativa complexidade de processamento; somente objetos rígidos como sementes, espículas, etc. podem ser observados no MEV com tratamento preliminar mínimo. Na sua grande maioria, o preparo das amostras inclui diversas etapas (Silveira, 1989).

- Coleta, seleção e limpeza

Como princípio básico, a amostra deve ser representativa da situação a ser analisada, evitando-se causar modificações que possam resultar na formação de avaliações equivocadas. Basicamente, as amostras devem possuir a dimensão mínima necessária para o estudo, embora muitas vezes seja importante trabalhar com objetos grandes; quanto maior a dimensão, maiores serão as dificuldades encontradas para uma boa imagem. A manipulação dos espécimes com pinça deve ser minimizada, preferindo-se um pincel fino para objetos secos e um conta-gotas para transferir peças em meio líquido.

- Estabilização da forma

As amostras, geralmente, são estabilizadas por fixação química, visando torná-las, ao mesmo tempo, condutoras. Da mesma maneira que em outra estrutura, a fixação química inicial responde pela integridade da amostra, sendo que o processamento anterior apenas garante a manutenção desta forma.

Na formulação do fixador, ajustam-se as condições ideais de concentração, pH, molaridade, etc., 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.

Vários agentes químicos de uso corrente em laboratório apresentam propriedades irritantes ou tóxicas. Todas devem ser manipuladas com prudência. Agentes carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, são por definição, as substâncias que induzem aberrações químicas irreversíveis no DNA cromossômico. Outros agentes são alergênicos e podem levar ao desenvolvimento de alergias devido à exposição continuada, seja por contato ou inalação. Recomenda-se, portanto, o máximo cuidado na manipulação das substâncias químicas, bem como dos resíduos decorrentes das experiências realizadas. O tetróxido de ósmio (OsO_4) precisa ser manipulado com o máximo cuidado, por ser um composto extremamente tóxico e volátil. Sempre que possível, deve ser utilizado em capela com boa ventilação.

- Desidratação e secagem das amostras

O espécime devidamente fixado por agentes químicos que o tornam resistente é desidratado com acetona ou etanol, posteriormente substituídos por gás carbônico líquido, na câmara do aparelho de ponto crítico. O CO_2 líquido é lentamente aquecido, e passa imperceptivelmente da fase líquida para a gasosa; a expansão deste gás dentro da câmara faz a pressão subir, até acima da pressão crítica do CO_2 (73 atm). Mantendo-se a temperatura da câmara acima de 31°C (temperatura crítica do CO_2) não há risco de liquefação do gás. Nesta transição de fase gradual, a densidade da fase líquida iguala aquela da fase gasosa. Portanto, a tensão superficial é zero e o espécime é seco sem a ultrapassagem de nenhum limite de fases, isto é, sem o efeito das forças atuantes de tensão superficial. Após a despressurização lenta da câmara até à pressão atmosférica, o espécime é removido seco da câmara, sem alterações sensíveis de forma.

- Montagem e cobertura

O espécime para MEV precisa ser montado no suporte porta-amostras do microscópio ("stub"), considerando a melhor orientação em relação ao feixe de varredura e o coletor de elétrons secundários. Conforme as dimensões do espécime, podem ser usados vários tipos de adesivos, representados por colas condutoras de prata ou carbono coloidal; esmalte de unha em quantidade mínima e fitas adesivas também podem ser empregadas. As fitas, por serem isolantes, devem ser recortadas em dimensões reduzidas e bordejadas com um filete de prata coloidal para melhorar a condutividade.

O trabalho de montagem é feito sob lupa estereoscópica, usando como instrumentos um estilete, palito ou uma pestana aderida a um suporte. Deve-se considerar que espécimes secos pelo método do CPD são especialmente frágeis, necessitando de bastante delicadeza para montagem.

A cobertura dos espécimes biológicos visa torná-los bons condutores térmicos e elétricos. Tanto os espécimes, como as lamínulas de vidro ou as fitas adesivas usadas na montagem são isolantes elétricos e ficam carregados negativamente durante a varredura do feixe eletrônico. Nestas condições, podem desenvolver um potencial elétrico localizado que deflete a sonda, introduzindo astigmatismo e brilho excessivo em alguns pontos. Devido ainda à irradiação do feixe, a amostra pode ficar aquecida e, se for sensível, pode mover-se ou mesmo ser destruída durante a observação no MEV.

A camada condutora é geralmente ouro ou carbono, evaporados em vácuo. O ouro (ou ouro/paládio) são usualmente depositados pelo processo de "sputtering", embora possam também ser evaporados em alto vácuo. No sistema de "sputtering" o depósito do metal é bastante eficiente, mesmo em objetos muito irregulares, pois os átomos atingem sua superfície oriundos de todas as direções.

Basicamente, no sistema de "sputtering", o metal é arrancado de um eletrodo recoberto com ouro, pelo bombardeio energético de íons positivos; o eletrodo de ouro é ligado ao potencial negativo de uma fonte de tensão da ordem de 1 a 2 KV. Os íons positivos são produzidos pela ionização do argônio, injetado na câmara de descarga.

A espessura da camada de ouro deve ser suficientemente fina para não influir na resolução da imagem, mas suficientemente espessa, para garantir uma boa produção de elétrons secundários, que serão usados para formar a imagem. Para espécimes mais sensíveis pode-se aplicar uma camada de carbono, evaporado em alto vácuo, antes da cobertura com ouro.

- Conservação das amostras

Amostras bem preparadas são altamente higroscópicas e devem ser fotografadas imediatamente no MEV. Elas podem ser conservadas por certo tempo em um dissecador contendo sílica-gel, se necessário. O maior risco desta conservação diz respeito à instabilidade das fitas adesivas usadas na montagem, pois elas tendem a se retrair, rompendo a condutividade do filme de cobertura. Embora nova camada possa sempre ser aplicada neste caso, é evidente que a espessura compromete a resolução.

- Condições de observação no MEV

O estudo de materiais biológicos envolve na grande maioria dos casos, informações de topografia da superfície, e para este tipo de imagem usam-se elétrons secundários (baixa energia), provenientes da interação do feixe primário com a camada de ouro que recobre o espécime. No estudo de materiais biológicos, geralmente são usadas tensões aceleradoras de 5 a 10 KV, podendo variar até 25 KV.

Para assegurar melhor imagem, o operador deve cuidar do alinhamento correto das lentes e do canhão, do ajuste do foco, da compensação do astigmatismo, etc. O registro fotográfico é, em geral, feito em negativos que têm dimensão menor do que o visor onde a imagem é formada; assim, a qualidade do filme usado e as condições do registro adequadas (brilho, velocidade da varredura, contraste) são também importantes.

Convém lembrar ainda que, nos microscópios de varredura, existe, normalmente, a possibilidade bastante interessante para o biólogo, de manipulação dos sinais do vídeo. Este recurso permite modular a intensidade luminosa, gerando efeitos de contraste diferenciado, mesmo em espécimes pouco favoráveis (onde se depara com efeitos de carga, por exemplo).

Estes recursos podem ser explorados para fazer ressaltar detalhes da amostra e colher mais informações a seu respeito.

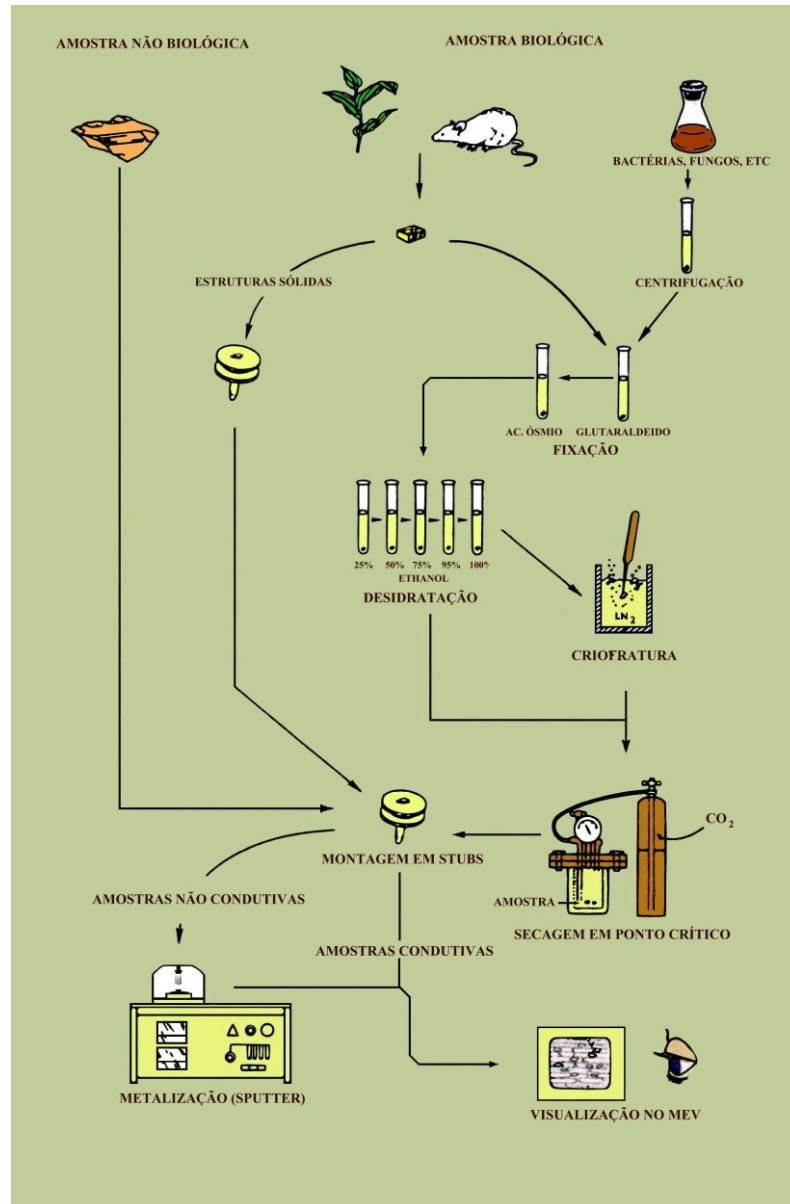


Figura 2. Esquema ilustrativo das principais etapas do processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura (Adaptação do original de Judy Murphy, 1982).

Processamento geral para amostras de tecidos animais e vegetais

A utilização do glutaraldeído como fixador para microscopia eletrônica pode ser recomendada para a maioria dos tecidos animais e vegetais, devido às suas propriedades de penetração e por precipitar prontamente as substâncias protéicas da célula, assegurando ótima preservação da ultraestrutura.

Partículas soltas, secas como, por exemplo grãos de pólen desidratados e esporos, são de preparo simples: basta fazer uma seleção sob lupa e dispersar o material, com orientação aleatória sobre uma fita adesiva. Este procedimento permite que sejam efetuadas análises em várias orientações do material.

Alguns tecidos vegetais podem apresentar dificuldade de penetração aos agentes químicos, o que pode ser contornado fixando-os sob vácuo (Louro *et al.*, 1987).

Basicamente, o procedimento usual segue a ordem: fixação/desidratação/secagem pelo método do "ponto crítico" e envolve as seguintes etapas:

- Fixação das amostras (1 a 5 mm³) durante 2 h até 24 h ou mais.
- Lavagem em solução tampão cacodilato ou fosfato, várias vezes.
- Pós-fixação em 1 ou 2% OsO₄ tamponado, durante 1 h.
- Lavagem novamente em solução tampão.
- Transferência das amostras, lavadas, para cestas permeáveis do aparelho de ponto crítico.
- Desidratação em banhos duplos de álcool (ou acetona): 30, 50, 70, 80, 95% e 100% de concentração. Várias trocas são necessárias para assegurar remoção completa da água.
- Secagem das amostras no aparelho de ponto crítico, usando gás carbônico.

Exemplos desse tipo de preparação são apresentadas nas figuras 3,4 e 5.

Processamento de fungos

O processamento de fungos fitopatogênicos pode ser realizado de duas formas distintas, dependendo da estrutura a ser observada ao microscópio eletrônico. Estruturas frágeis, com alto grau de umidade devem ser previamente fixadas, desidratadas e metalizadas para posterior observação. Estruturas rígidas, geralmente relacionadas ao processo de propagação, como por exemplo esporos de ferrugem, podem ser secos em estufas, montados sobre porta amostras, metalizados e observados. Neste caso, geralmente são coletadas porções de ramos, folhas ou frutos que apresentem lesões ocasionadas pelo fungo.

Exemplos desse tipo de preparação são apresentadas nas figuras 6 e 7.

Processamento de Bactérias

A preparação de bactérias envolve técnicas distintas, dependendo do substrato em que se encontram:

1. Infecção externa em tecido animal ou vegetal

Tecidos animais ou vegetais, que apresentem infecção externa por bactérias, são geralmente preparados, como para observação de qualquer estrutura externa. Normalmente as bactérias estão aderidas às estruturas dos tecidos e, permanecem fixadas a eles, após todo o processo de preparação da amostra. (Figura 8A).

2. Infecção interna em tecido animal ou vegetal

Neste caso, utiliza-se a técnica denominada Criofratura. Inicialmente, a amostra é colocada no fixador apropriado, conforme a origem do tecido (animal ou vegetal). Após os banhos e álcool ou acetona a 100%, as amostras são colocadas no interior de pequenos tubos de "Parafilm®" confeccionados anteriormente. Após vedação das extremidades, faz-se sua transferência para o interior de uma cuba de isopor contendo nitrogênio líquido. As amostras, depois de congeladas, são quebradas (fraturadas) através de golpes de uma navalha sobre uma superfície de metal, também congelada com nitrogênio líquido. Todos os fragmentos são recolhidos, novamente, para um frasco contendo acetona ou álcool absoluto, onde os fragmentos maiores de Parafilm® são separados e retirados. As peças são levadas ao ponto crítico para desidratação e, posteriormente, montadas no porta amostra, para metalização. A distribuição dos fragmentos de tamanho muito pequeno, durante a montagem, pode ser aleatória, pois qualquer posição do fragmento da amostra, tem possibilidade de conter o material que desejamos analisar.

Resultados desse tipo de preparação são apresentados nas figuras 8B e 8C.

3. Inoculadas em meio de cultura

Quando as bactérias são isoladas em meio de cultura há a possibilidade de retirar pequenos fragmentos do meio contendo colônias. Estes fragmentos geralmente são cortados com aproximadamente 1mm² e o mínimo de espessura possível (0,5 mm). Deve-se procurar locais onde existam boas concentrações de bactérias, pois durante o processo de preparação podem ocorrer perdas consideráveis desses microorganismos. As amostras coletadas são colocadas

diretamente na solução fixadora, recebem os banhos de álcool ou acetona necessários. São submetidas ao ponto crítico e montadas sobre os porta-amostras. Durante o processamento, ocorre leve curvatura do meio de cultura, o qual deve ser considerado durante o processo de montagem. Geralmente, no lado convexo da amostra encontram-se as bactérias e, portanto, esta face deve permanecer voltada para cima. As demais etapas devem seguir o procedimento padrão.

Procedimento para visualização de estruturas de artrópodes e vermes

a) Artrópodes:

Pequenos insetos devem ser inicialmente narcotizados para preservar a forma distendida. Normalmente não exigem preparações mais sofisticadas. Secagem em estufa a 37°C, fixação ao porta-amostra utilizando tinta prata para melhorar a condutividade e metalização são os procedimentos necessários em observações rotineiras. A Figura 9 mostra o resultado final da preparação.

Insetos que apresentam estruturas delicadas ou larvas, passíveis de deformações por secagem direta, necessitam ser desidratados pelo método do ponto crítico após o processo de fixação convencional. Organismos mais resistentes, podem ser limpos no estágio de desidratação (100% etanol), usando um banho de ultra-som. Para assegurar boa penetração do fixador, acrescenta-se 1 a 2 gotas de triton X-100 ao fixador.

b) Vermes:

Nematóides devem ser inicialmente limpos de partículas indesejáveis, fazendo-os passar, ainda vivos, através de papel filtro, imerso em água. São fixados, desidratados com álcool ou acetona e submetidos ao ponto crítico em pequenas "gaiolas" confeccionadas com tela de plâncton ou em cápsulas de porcelana porosa, apropriadas para desidratação de estruturas muito pequenas. Durante o processo de montagem no "stub", devem seguir a orientação de um fio de cabelo, previamente aderido ao porta-amostra, sendo colocados um a um, com o auxílio de uma lupa, orientados de forma que a porção a ser visualizada fique apoiada sobre o fio de cabelo.

A visualização é apresentada na Figura 10.

Processamento de amostras humanas

a) O processamento inicial do material depende da observação a ser feita. Fragmentos de tecidos e organismos maiores, geralmente precisam de uma limpeza prévia a fim de remover detritos, sangue ou muco. A limpeza deve ser feita antes da fixação, usando solução de Ringer; sacarose a 0,2 M; EDTA a 1%; carbonato de cálcio 1% ou 0,1% hipoclorito de sódio. Em casos onde a limpeza preliminar pode afetar a estrutura a observar, esta deve ser evitada. Podem ser retirados fragmentos de menor tamanho e em maior quantidade, aumentando-se as chances de obter resultados satisfatórios. O procedimento rotineiro segue as etapas normais do processo padrão de preparação de tecidos animais. A Figura 11 mostra o resultado final da preparação.

b) Estruturas rígidas como dentes e cabelos são processados sem muita preparação prévia, geralmente podem ser aderidos ao porta-amostra, metalizados e observados. Um cuidado especial a ser observado em relação a amostras com tamanho relativamente grande, refere-se à condutibilidade elétrica. O uso de fitas adesivas pode provocar o isolamento do material. Nestes casos é essencial contornar a amostra com prata condutora, antes do processo de metalização com ouro. O resultado desse tipo de preparação é apresentado na figura 12.

Processamento de materiais

O processamento de materiais, ou seja, amostras não-biológicas, é relativamente fácil pois dispensa preparações prévias. Neste caso, não são utilizadas soluções fixadoras nem é realizado a eliminação de líquido através do aparelho de ponto crítico. O requisito obrigatório constitui-se na necessidade de que a amostra coletada seja o mais representativo das condições estáveis do material a ser examinado. Devem ser evitados desgastes por atrito, contaminações por líquidos e poeiras. Após a coleta da amostra, esta deve ser fixada ao porta-amostra através de fita adesiva apropriada, posteriormente é realizado o processo de metalização. Alguns exemplos desse tipo de preparação são apresentados nas figuras 13 e 14.

Vizualização de compostos orgânicos

Na maioria das plantas os açúcares acumulados são armazenados na forma de amido. Devido à sua tendência em formar hélices, as moléculas de amido tendem a aglomerar-se em grãos. Através de microscopia eletrônica de varredura as estruturas arredondadas que correspondem aos grãos de amido, organizados em amiloplastos, podem ser visualizados. O processo básico consiste em colocar o material a ser observado em fixador contendo

glutaraldeído e cacodilato de sódio, pós-fixando em solução tamponada de ósmio. Durante a desidratação (etanol 100%) faz-se a criofratura utilizando nitrogênio líquido. Na observação, no interior das células quebradas, podem ser visualizados aglomerados que correspondem aos grãos de amido.

Ceras que revestem frutos também podem ser visualizadas, utilizando equipamentos apropriados que promovem a preparação da amostra em temperaturas extremamente baixas, devido à facilidade com que estes compostos são removidos durante o processamento. Um método alternativo pode ser utilizado, cortando-se secções finas da casca do fruto com posterior secagem em dessecador contendo sílica gel. Após montada no porta-amostra e metalizada, a amostra pode ser observada.

Alguns exemplos dessa visualização são mostrados nas figuras 15 e 16.

Reconhecimento de artefatos

A preparação incorreta da amostra pode ocasionar modificações consideráveis no material em estudo, resultando em diagnósticos totalmente equivocados ou imprecisos. O primeiro fator a considerar no trabalho que está sendo realizado é o adequado levantamento bibliográfico sobre o assunto em estudo. Considerar atividades realizadas anteriormente, resultados obtidos, dificuldades encontradas. Regulagens incorretas de equipamentos podem ocasionar deformações nas estruturas a observar. Amostras coletadas em condições adversas, mal acondicionadas, submetidas a variações de umidade e temperatura, podem apresentar variações não condizentes com a realidade.

Descrições detalhadas envolvendo o estudo de artefatos em amostras biológicas são apresentadas por Crang & Klomparens, 1988. Entretanto, como norma geral, amostras que podem sofrer variações, devem ser coletadas e colocadas na solução fixadora apropriada o mais rapidamente possível, visando paralisar os processos metabólicos que estão se desenvolvendo e que poderão interferir na análise do resultado final. Devem ser preparadas com o máximo de rigor técnico e apresentar reprodutividade de resultados.

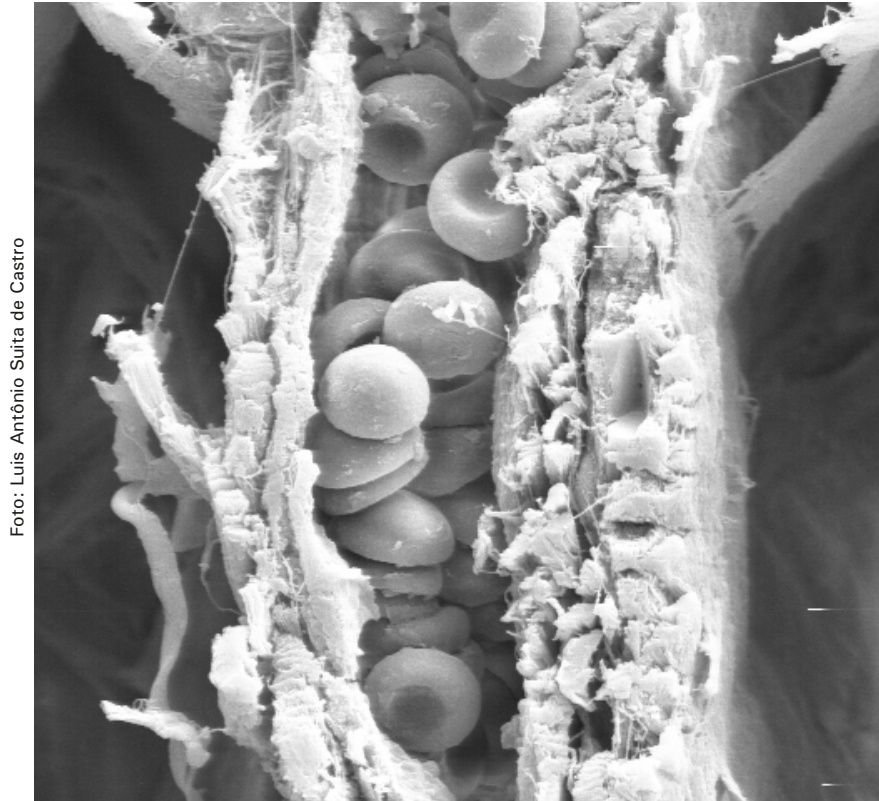
Resultados obtidos**Processamento geral para amostras de tecidos animais e vegetais**

Foto: Luis Antônio Suíta de Castro

Figura 3. Micrografia eletrônica de eritrócitos (glóbulos vermelhos) no interior de um tecido animal (25.000 X).

Foto: Luis Antônio Suiça de Castro

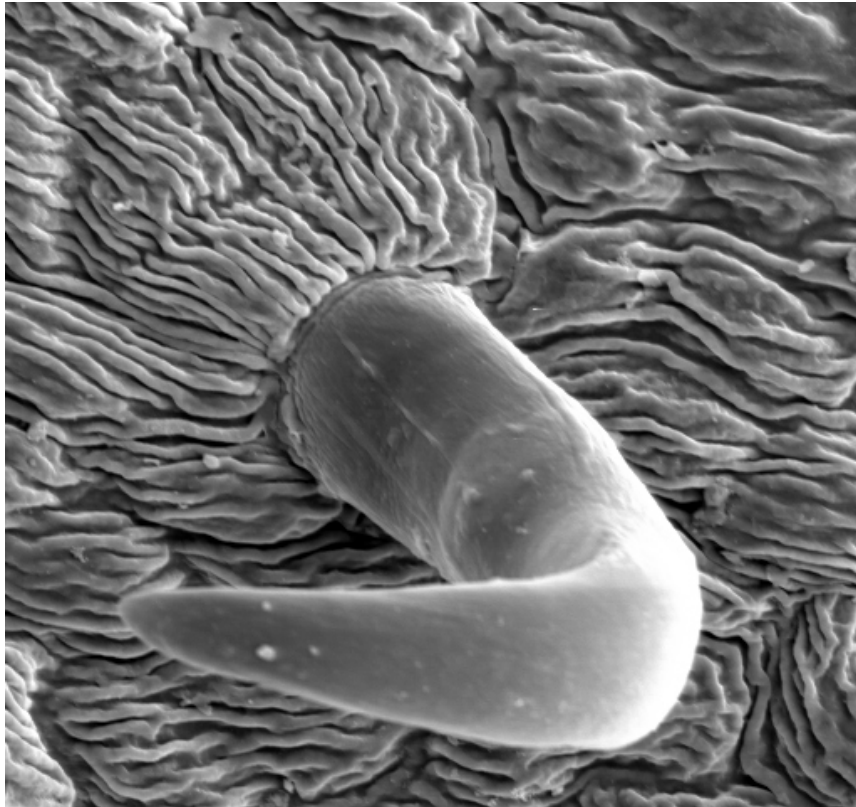


Figura 4. Visualização de tricoma em sépalas de pessegueiro (1.000 X).

Foto: Luis Antônio Suita de Castro



Figura 5. Visualização de estômatos em folhas de pessegueiro (1.900 X).

Processamento de Fungos

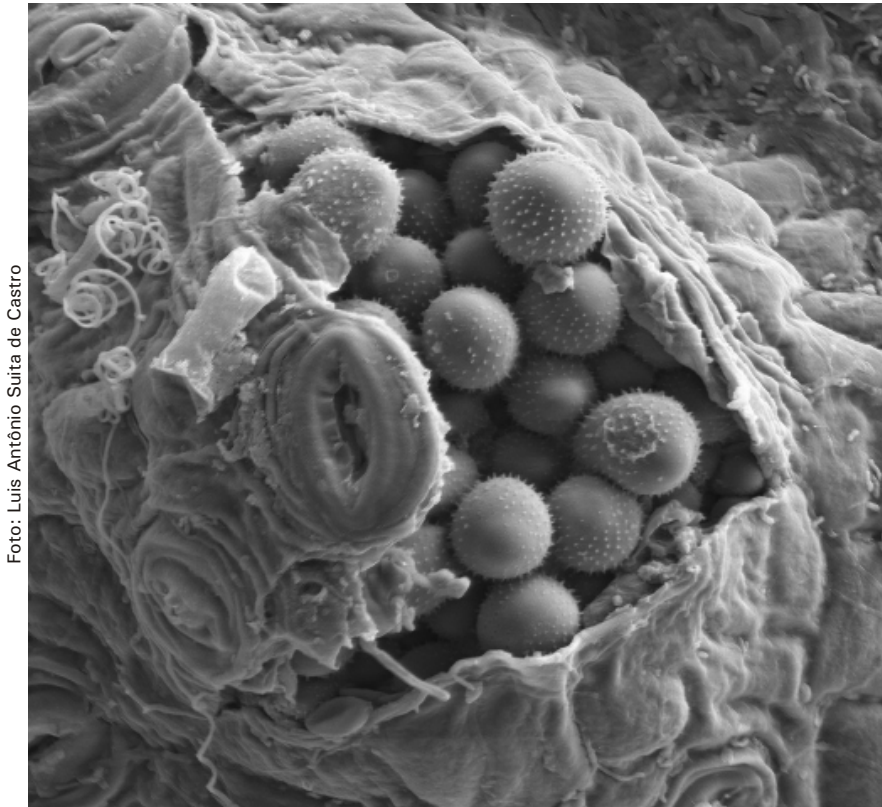


Foto: Luis Antônio Suíta de Castro

Figura 6. Lesões ocasionadas pela infecção do fungo *Tranzchelia discolor* (Funckel) Tranz & Livt, em folhas de pessegueiro (5.000 X).

Foto: Luis Antônio Suiça de Castro

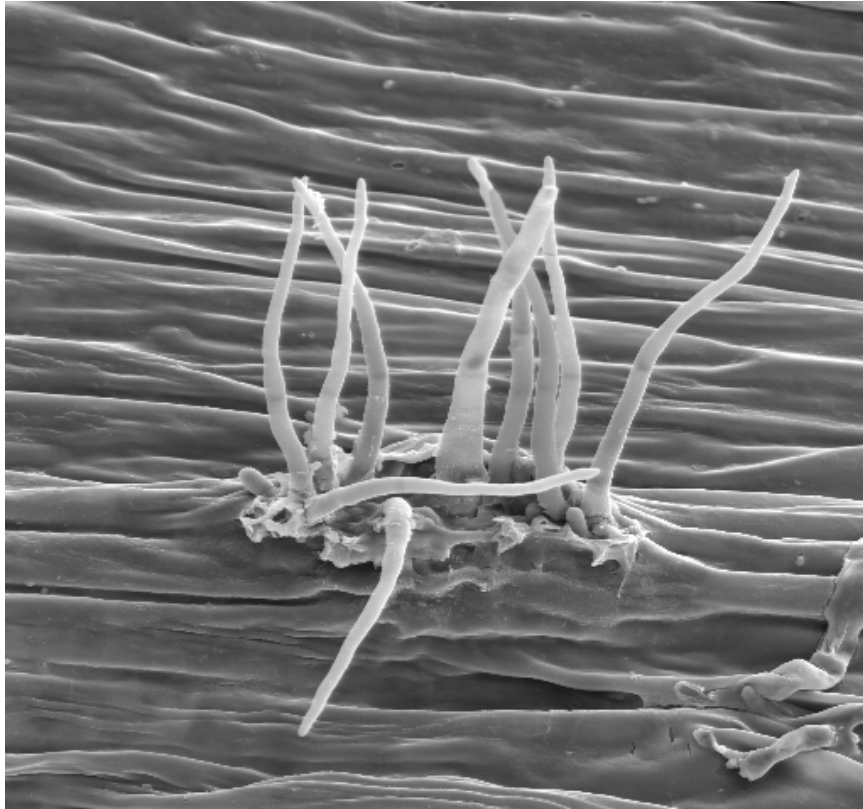


Figura 7. Desenvolvimento do fungo *Colletotricum lindemuthianum* em plantas de feijoeiro (700 X).

Processamento de Bactérias

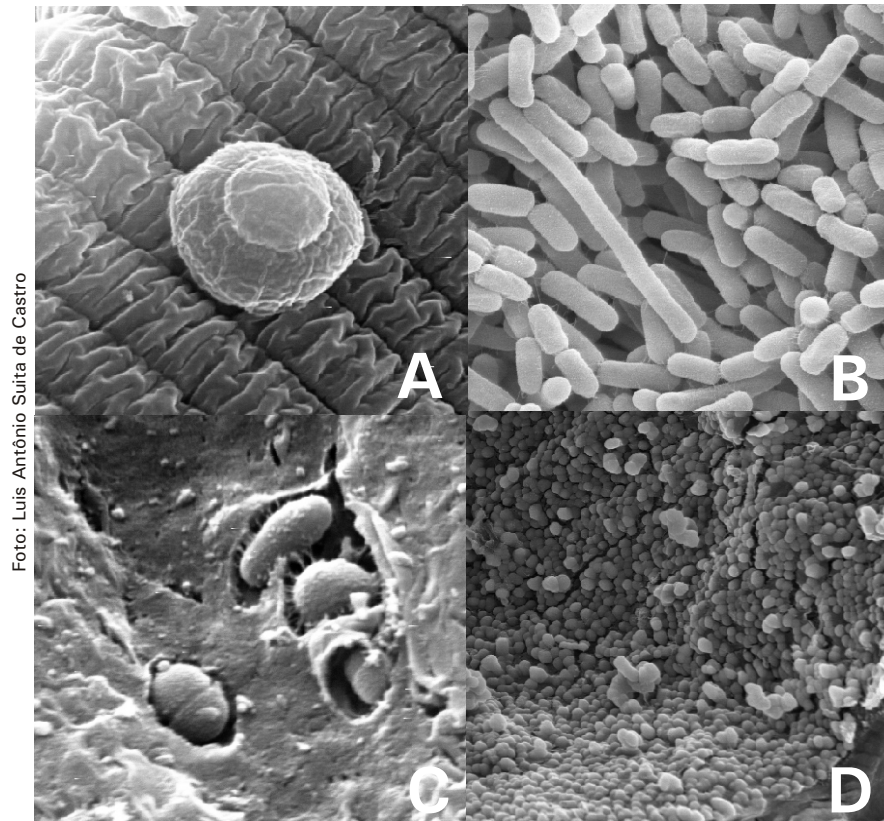


Foto: Luis Antônio Saita de Castro

Figura 8. Diferentes tipos de processamento para visualização de bactérias: (A) infecção externa em tecido animal (14.000 X), (B) inoculação em meio de cultura (5.000 X), (C) infecção externa em tecido humano(5.000 X), (D) infecção interna em tecido vegetal -criofratura (3.000 X).

Procedimento para visualização de estruturas de artrópodes e vermes

Foto: Luis Antônio Suita de Castro

Figura 9. Extremidade do membro locomotor de um inseto (*Ochetina* spp.) (200 X)

Foto: Luis Antônio Saita de Castro

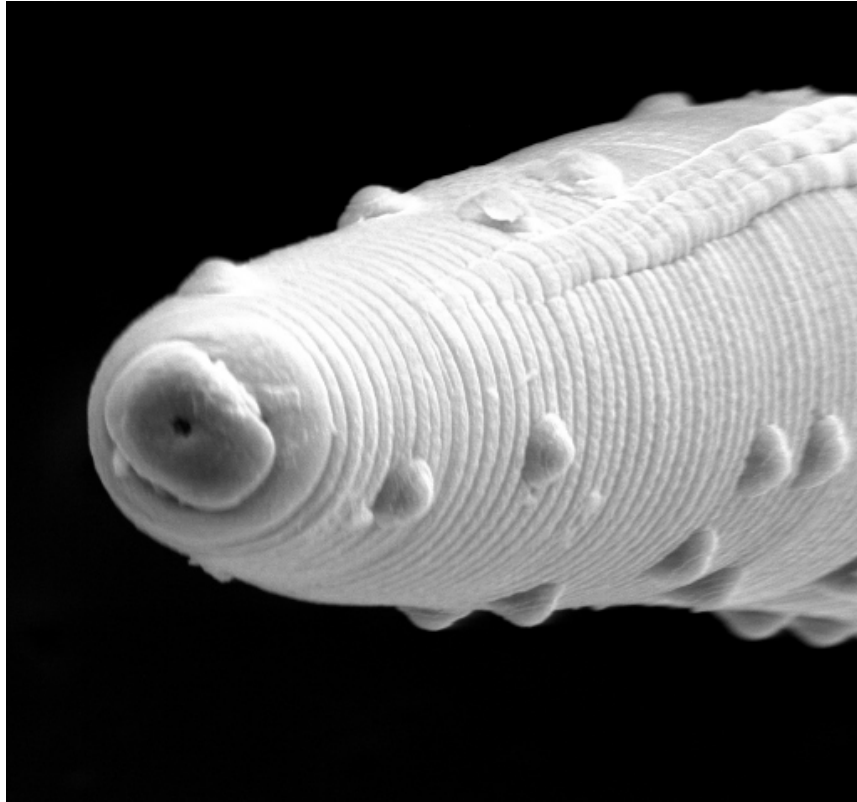


Figura 10. Porção anterior de um nematóide infectado por esporos da bactéria *Pasteuria penetrans* (3.000 X).

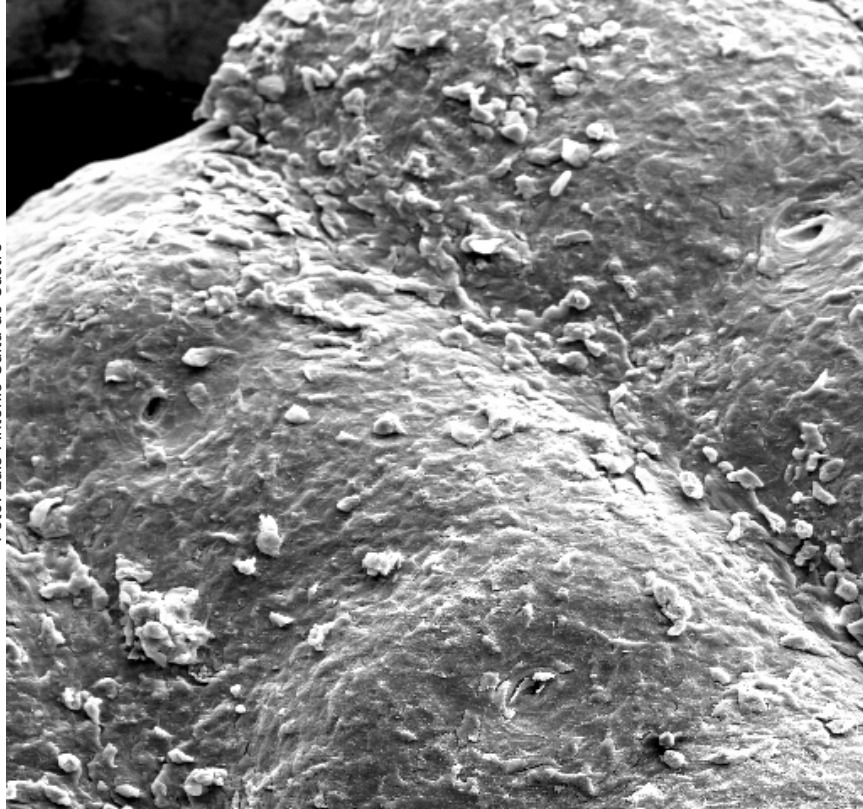
Processamento de amostras humanas

Foto: Luis Antônio Suito de Castro

Figura 11. Visualização da superfície da pele humana (125 X) (notar os pequenos orifícios correspondentes aos poros).

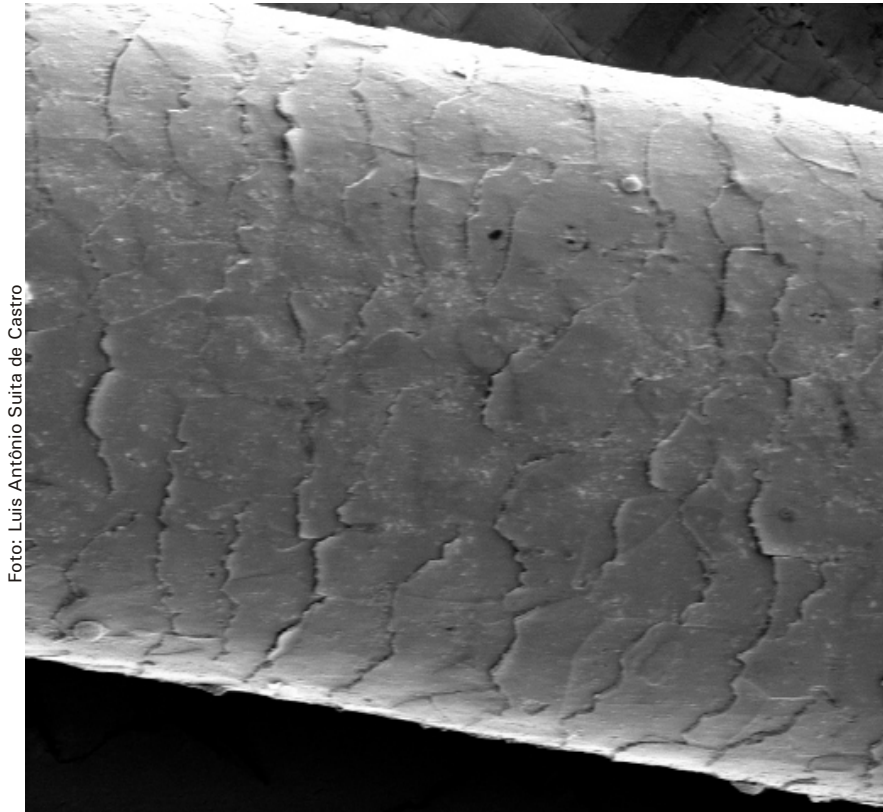


Foto: Luis Antônio Suiça de Castro

Figura 12. Visualização de um fio de cabelo, permitindo a observação das escamas estruturais (1.000 X).

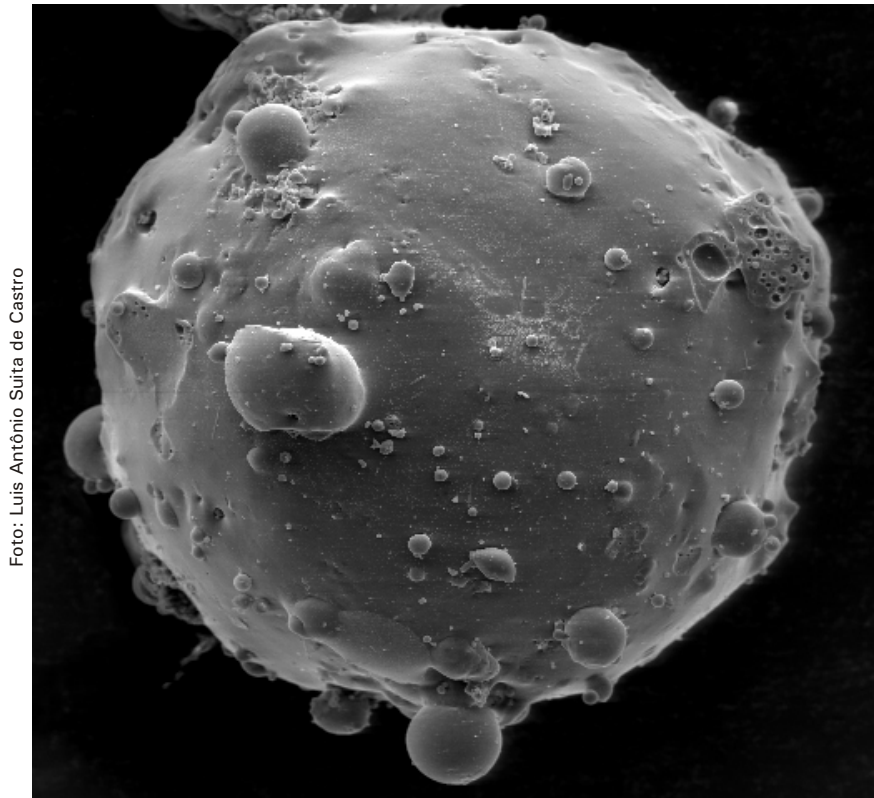
Processamento de materiais

Foto: Luis Antônio Suíta de Castro

Figura 13. Visualização de uma partícula de cinza de carvão mineral (470 X).

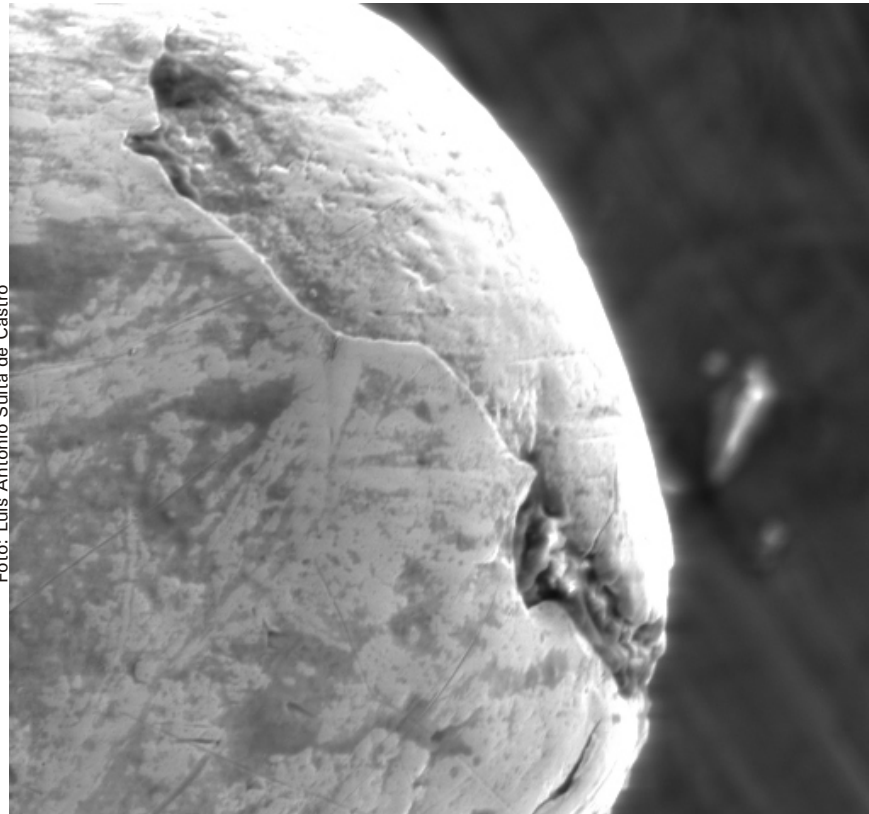


Foto: Luis Antônio Suiça de Castro

Figura 14. Extremidade (ponta) de uma agulha de costura confeccionada em aço (1.000 X).

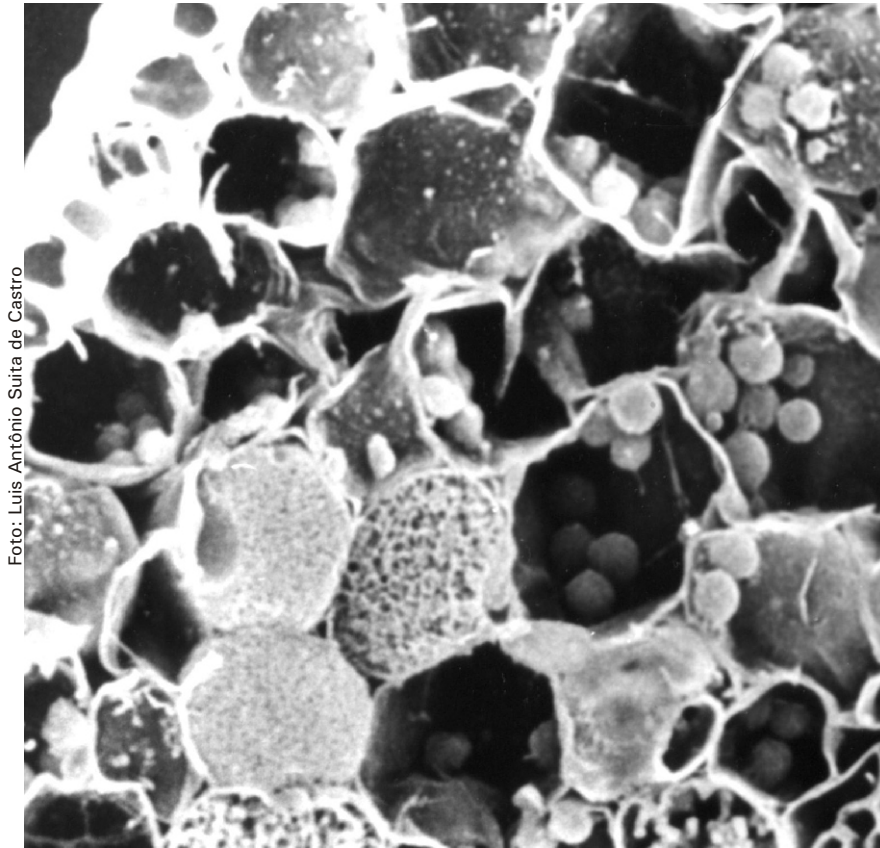
Visualização de compostos orgânicos

Foto: Luis Antônio Suíta de Castro

Figura 15. Presença de grãos de amido (estruturas arredondadas) no interior de células vegetais de armazenamento (540 X).

Foto: Luis Antônio Suiça de Castro

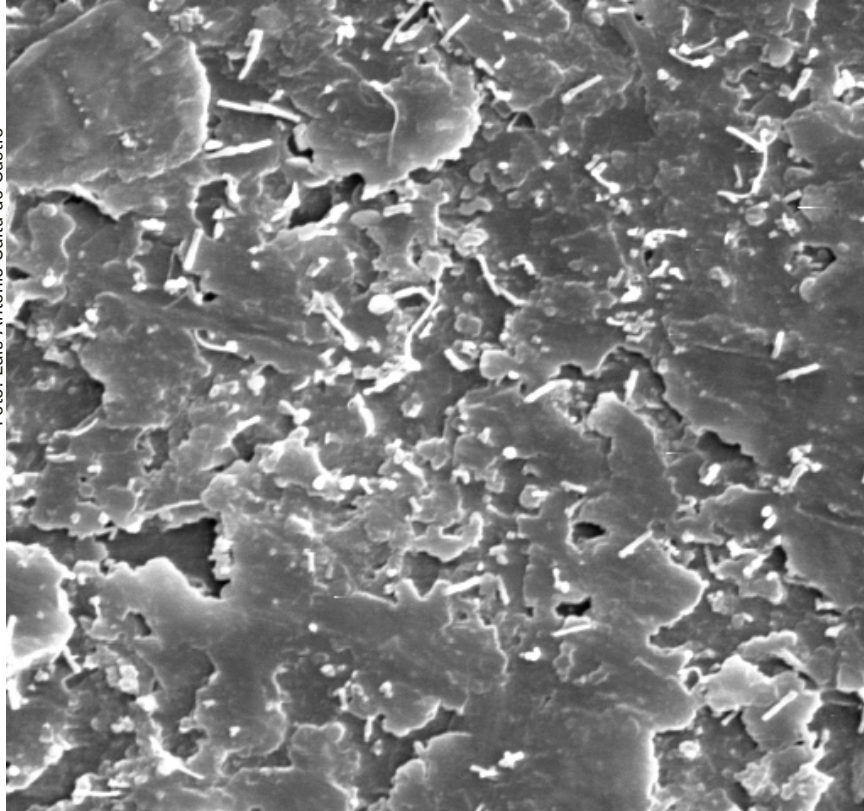


Figura 16. Visualização da camada de cera que recobre a epiderme de maçãs, cultivar Fuji (3.000 X).

Referências Bibliográficas

- CRANG, R.F.E.; KLOMPARENS, K.L. **Artifacts in biological electron microscopy**. New York: Plenum Press, 1988. 233p.
- DAWES, C.J. **Biological techniques in electron microscopy**. New York: Barnes & Noble, 1971. 193p.
- DYKSTRA, M.J. **A manual of applied techniques for biological electron microscopy**. New York: Plenum Press, 1993. 257p.
- HALL, J.L.; HAWES, C. **Electron microscopy of plant cell**. London: Academic Press, 1991. 466p.
- HAYAT, M.A. **Basic electron microscopy techniques**. New York: UNR, 1972. 119p.
- KESSEL, R.G.; SHIH, C.Y. **Scanning electron microscopy in biology**. New York: Springer-Verlag, 1976. 190 p.
- LOURO, R.P.; MIGUENS, F.C.; MACHADO, R.D. **Ontogenese dos tricomas da lâmina foliar de *Andradea floribunda*. Fr. Allem. In: Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, p.19-20, 1987. Caxambu.**
- MURPHY, J. **Specimen preparation for Scanning Electron Microscopy**. New York: Springer-Verlag, 1982. 220 p.
- RAVEN, P.H. **Biology of plants**. New York: Worth Publisher, 1996, 728 p.
- ROBINSON, D.G.; EHLERS, U.; HERKEN, R.; HERRMANN, B.; MAYER, F.; SCCHÜRMAN, F.W. **Methods of preparation for electron microscopy**. New York: Springer-Verlag, 1987. 190 p.
- SILVEIRA, M. **Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura**. In: **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. São Paulo: USP, 1989. v.1, p.71-79.

Agradecimentos

O autor agradece a colaboração e a dedicação dos funcionários Valter Lopes Abrantes e Nara Eliane Moreira Rocha na realização desse trabalho.