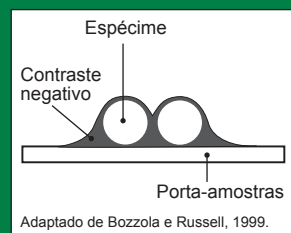




VISTA LATERAL



COMUNICADO  
TÉCNICO

248

Fortaleza, CE  
Abril, 2019

**Embrapa**

## Preparo de Amostras para Observação de Nanoestruturas em Microscópio Eletrônico de Varredura Acoplado a Detector STEM

Celli Rodrigues Muniz  
Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo  
Morsyleide de Freitas Rosa

# Preparo de Amostras para Observação de Nanoestruturas em Microscópio Eletrônico de Varredura Acoplado a Detector STEM<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Celli Rodrigues Muniz, bióloga, doutora em Biotecnologia, Analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo, engenheira de alimentos, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Morsyleide de Freitas Rosa, engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.

## Introdução

Nas últimas décadas, a nanotecnologia tem emergido como um campo revolucionário da ciência e tecnologia e suas aplicações trazem avanços em distintas áreas, incluindo computação e comunicação, biosistemas e ciências médicas, agricultura, ciência e tecnologia de alimentos, engenharia de materiais, ciências ambientais, dentre outras. Nesse cenário, as etapas de pesquisa, síntese, desenvolvimento e elaboração de materiais e estruturas em escala nanométrica devem estar aliadas a avançados métodos e ferramentas de investigação, incluindo-se a microscopia eletrônica em suas variadas vertentes (Vance, et al., 2015). As diferentes abordagens instrumentais da microscopia eletrônica, tais como microscopia eletrônica de varredura

(MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), MEV com emissão de campo, MEV com feixe de íon focalizado, MEV acoplado ao STEM, etc., perfazem requisitos fundamentais na análise de constituintes, sistemas e materiais nanoestruturados (Leach, 2011). Neste trabalho, apresenta-se a técnica de visualização de nanoestruturas dispersas em solução, não condutoras e de difícil contraste, aplicando-se a contrastação negativa como realce sob detector ‘STEM’ acoplado ao MEV convencional, com filamento de tungstênio e coluna submetida a alto vácuo.

## Detector STEM

O acrônimo “STEM” significa ‘Scanning Transmission Electron Microscopy’ e utiliza-se de uma delgada sonda de elétrons que varre uma

amostra ou espécime de fina espessura e a intensidade do sinal de elétrons transmitidos é medida pelo uso de detectores específicos para esse fim. A imagem final é construída ponto a ponto (pixel a pixel), da mesma forma que ocorre no microscópio eletrônico de varredura (MEV), porém constitui-se em uma imagem de transmissão de elétrons. O detector encontra-se acoplado a um MEV convencional funcionando sob alto vácuo (Figura 1), porém a voltagem de aceleração dos elétrons usada durante a formação da imagem é maior do que a comumente usada para amostras biológicas. Ressalta-se que o detector STEM também pode estar inserido em outros modelos de MEV, tais como o MEV com emissão de campo (MEV-FEG, Field Emission Gun), o que possibilitaria imagens com maior resolução. Quando aliada à fina espessura do feixe (sob

alto vácuo), permite a visualização de estruturas nanométricas, dispersas em líquidos ou soluções, pelo uso da técnica de contrastação negativa ou de estruturas subcelulares, organelas, células e tecidos biológicos, no caso de espécimes obtidos por ultramicrotomia. Os elétrons que emergem da amostra podem ser coletados em detectores do tipo “Dark Field” (amostras possuem uma aparência clara em relação ao campo) ou “Bright Field” (amostras possuem uma aparência escura em relação ao campo).

## Contrastação negativa

A contrastação negativa é um método simples e rápido para se estudar a morfologia e estrutura de espécimes particulados, tais como células em suspensão, fragmentos celulares ou macromoléculas isoladas (Ohi et al., 2004; Zhang et al., 2010). Nesse caso, as amostras são submetidas a um contrastante negativo que contém metal, como, por exemplo, o ácido fosfotúngstico. Na secagem, os átomos do metal, que são eletrodensos, recobrem a amostra, envelopando-a. A amostra aparece escura, enquanto que o fundo aparece claro, na visualização em modo “Bright Field”. Sem contrastação, as amostras que não são naturalmente eletrodensas, seriam transparentes, com grande dificuldade de visualização (Hayat, 2012).

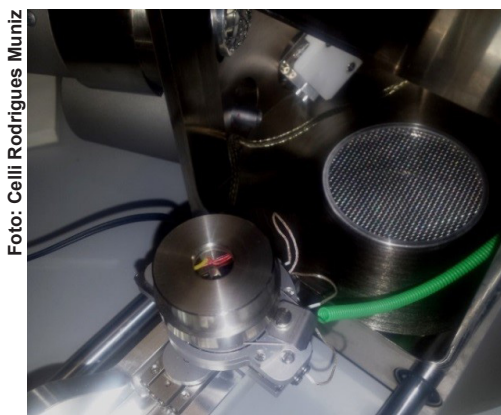


Foto: Celli Rodrigues Muniz

**Figura 1.** Detector STEM acoplado ao MEV convencional.

## Preparo de nanoestruturas para visualização em MEV-STEM

Nanoestruturas tais como nanofibrilas, nanopartículas ou nanocristais, dispersas em solução, constituem-se em materiais aptos à visualização em MEV-STEM. Recomenda-se que as variáveis de concentração ou proporção da diluição da nanoestrutura no solvente e o tipo de solvente mais adequado à dispersão dos particulados sejam testados. Especificamente no caso de nanofibras de celulose ou de nanocristais, o solvente mais adequado para dispersá-los é água destilada, em diluições que podem variar de 5 a 30%. Soluções mais concentradas do que 30% podem gerar imagens muito poluídas, com impedimento da visualização das estruturas individualizadas. As amostras a serem visualizadas são montadas em grades (“grids”), próprias para microscopia eletrônica de transmissão. Recomenda-se que sejam utilizadas grades recobertas com filme de Formvar, sobre o qual ficarão retidas as nanoestruturas. As amostras em solução são homogeneizadas em agitador tipo vórtex. O ultrassom, como método de dispersão de amostras que tenham tendência à aglomeração, pode tornar-se bastante adequado para dispersar as amostras e individualizar as estruturas a serem visualizadas. A

seguir, utiliza-se um volume de 100  $\mu\text{L}$  para a deposição sobre as grades, deixando-se a amostra repousar por 3 minutos. Com a ponta de um pedaço de papel de filtro qualitativo, encosta-se levemente na borda da grade, para que o excesso de líquido seja absorvido pelo papel. A seguir, adiciona-se o mesmo volume (100  $\mu\text{L}$ ) de uma solução 1% em água de ácido fosfotúngstico. Novamente, deixa-se repousar por 3 minutos, drenando, por fim, o excesso de líquido com o papel. Nesse momento, as grades, completamente secas, estão prontas para a visualização no MEV-STEM. Com a ajuda de uma pinça de aço, específica para microscopia eletrônica de transmissão, transfere-se a grade para o porta-amostras e procede-se à visualização, utilizando-se uma aceleração de voltagem adequada de 30 KV e diminuindo-se a intensidade do feixe, para que se reduza o diâmetro do feixe de elétrons. Após a escolha da área a ser registrada, sugere-se uma varredura lenta durante a tomada de imagens, que ficam com melhor qualidade e maior número de *pixels*, ainda que demandem mais tempo para sua finalização.

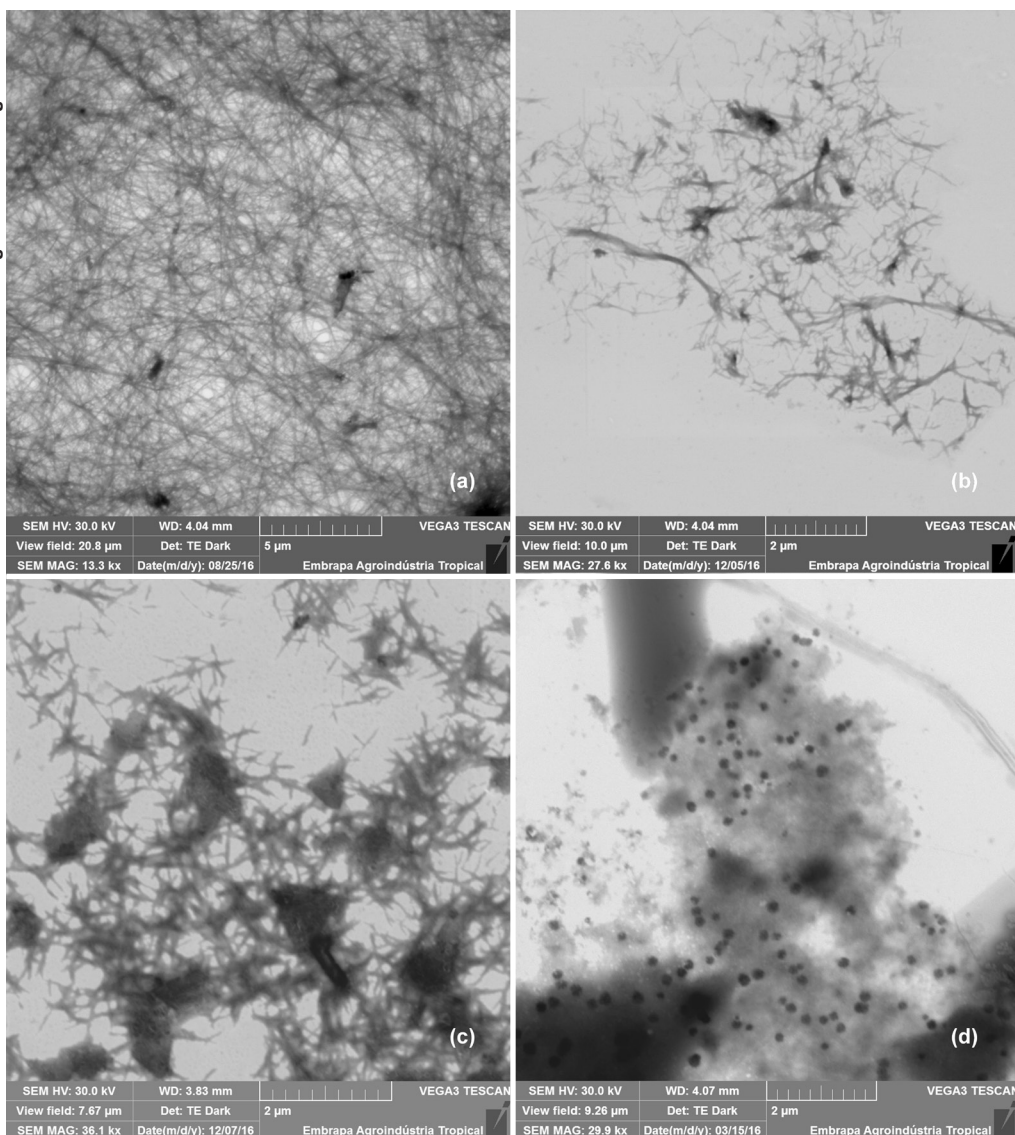
## Imagens de nanoestruturas visualizadas em MEV-STEM

Exemplos de imagens obtidas com a técnica descrita estão apresentadas na Figura 2 e foram obtidas utilizando-se

o modo 'campo claro'. As imagens correspondem a amostras de nanofibras de celulose, nanocristais de celulose e

de amido, oriundas do Laboratório de Tecnologia da Biomassa, da Embrapa Agroindústria Tropical.

Imagens: Celli Rodrigues Muniz



**Figura 2.** Imagens de nanoestruturas obtidas após técnica de contrastação negativa e visualização em MEV STEM. (a) Nanofibras de celulose; (b, c) nanocristais de celulose; (d) partículas de nanoamido.

Observa-se que as amostras tiveram uma contrastação eficiente, permitindo visualização individualizada das partículas. Portanto, a técnica descrita apresenta-se como uma das alternativas possíveis para visualização de nanopartículas dispersas em solução.

## Referências

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron**

**Microscopy**: principles and techniques for biologists. Boston: Jones and Bartlett, 1999. 670 p.

HAYAT, M. A. **Basic techniques for transmission electron microscopy**. Amsterdam: Elsevier, 2012 , 440 p.

LEACH, R. K.; BOYD, R.; BURKE, T.; DANZEBRINK, H-U.; DIRSCHERL, K.; DZIOMBA, T.; GEE, M.; KOENDERS, L.; MORAZZANI, V.; PIDDUCKROYUNGER, W. E. S.; YACOOT,

A. The European nanometrology landscape.

**Nanotechnology**, v. 22, n. 6, 15 p, 2011.

OHI, M.; LI, Y.; CHENG, Y.; WALZ, T. Negative staining and image classification – powerful tools in modern electron microscopy. **Biology Procedures Online**, v. 6, n. 1, p. 23-24, 2004.

VANCE, M. E.; KUIKEN, T.; VEJERANO, E. P.; MCGINNIS, S. P.; HOCHHELLA JR., M. F.; REJESKI, D.; HULL, M. S. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 6, p. 1769-1780, 2015.

ZHANG, L.; SONG, J.; CAVIGIOLIO, G.; ISHIDA, B. Y.; ZHANG, S.; KANE, J. P.; WEISGRABER, K. H.; ODA, M. N.; RYE, K.; POWNALL, H. J.; REN, G. Morphology and structure of lipoproteins revealed by an optimized negative-staining protocol of electron microscopy. **Journal of Lipid Research**, v. 52, p. 175-184, 2011.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici  
60511-110, Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109 / 3391-7195  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição  
(2019): on-line



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente  
*Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*  
Secretária-executiva  
*Celli Rodrigues Muniz*  
Secretária-administrativa  
*Eveline de Castro Menezes*  
Membros  
*Marlos Alves Bezerra, Ana Cristina Portugal  
Pinto de Carvalho, Deborah dos Santos  
Garruti, Dheyne Silva Melo,  
Ana Iraidy Santa Brígida,  
Eliana Sousa Ximenes*  
Supervisão editorial  
*Ana Elisa Galvão Sidrim*  
Revisão de texto  
*José Cesamildo Cruz Magalhães*  
Normalização bibliográfica  
*Rita de Cassia Costa Cid*  
Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*  
Editoração eletrônica  
*Arlito Nobre de Oliveira*  
Imagens da capa  
*Celli Rodrigues Muniz*