

Foto: Caue Ribeiro



Sistema de Micromanipulação para Montagem de Amostras em Microscopia

Caue Ribeiro¹
Emerson Rodrigues de Camargo²
Clovis Isberto Biscegli³
Antonio Pereira de Novaes⁴

O desenvolvimento de nanoestruturas é objeto, atualmente, de intensa discussão a respeito das novas propriedades e alternativas obtidas pela manipulação de estruturas sólidas na nanoescala. Entre as possibilidades em agricultura e saneamento ambiental, contam-se o desenvolvimento de nanopartículas de prata coloidal e de dióxido de titânio como agentes bactericidas (KAMAT e MEISEL, 2003), desenvolvimento de nanopartículas de óxido de cério para redução de emissão de poluentes em sistemas de combustão (ZHANG et al., 2006), entre outros. A disseminação destas tecnologias está em grande parte associada ao avanço nas técnicas instrumentais para observação de nanopartículas e nanoestruturas. Características observadas em técnicas espectroscópicas, como em espectroscopia de fotoluminescência e espectroscopia no UV-Vis, têm sido correlacionadas com comportamentos da nanoescala (BRUS, 1986), permitindo a avaliação de processos de síntese de nanopartículas ou nanoestruturas indiretamente. Porém, a visualização direta desses sistemas na escala nanométrica só é possível por meio de técnicas adequadas de microscopia. Avanços recentes são descritos no uso de microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e, mais especificamente, em microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (LEITE, 2004).

Esta última técnica apresenta um conjunto de particularidades que a torna uma ferramenta versátil na análise de nanopartículas (WANG, 2000). A formação da imagem é feita a partir de contrastes pela difração dos

elétrons passando à amostra, e deste ponto, obtém-se informações estruturais da amostra (fases cristalinas presentes, orientação, alinhamento, etc). Estas informações, em última análise, permitem inclusive a observação direta dos planos cristalinos de uma amostra suficientemente fina (abaixo de 20 nm), o que torna a técnica extremamente atrativa para o estudo de nanopartículas cristalinas. A associação a detectores que possam avaliar outras interações ocorridas na amostra pela passagem do feixe eletrônico, como a geração de raios X (espectroscopia de dispersão de energia de raios X) permite associar à técnica a avaliação de composição química do material, em pontos específicos. De forma geral a microscopia eletrônica de transmissão é a técnica preferida de visualização na síntese de nanopartículas de tamanhos abaixo de 20 nm.

No entanto, a disponibilidade da técnica depende muitas vezes de condições operacionais que devem ser adequadamente observadas. A correta formação de imagem necessita que a amostra na câmara esteja em vácuo da ordem de 10^{-5} a 10^{-7} Torr, o que somente pode ser atingido com um tempo longo de permanência da amostra na câmara, em geral, não inferior a 30 minutos. Também, a principal fonte de contaminação de amostras dentro da câmara do microscópio é a eventual presença de material orgânico, proveniente de manuseio, ambiente mal limpo, etc, que em níveis de vácuo baixos (10^{-5} Torr) podem vaporizar, re-depositando-se sobre a amostra e impedindo a correta observação. Como a cada troca de

¹Eng. Materiais, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, caue@cnpdia.embrapa.br

²Químico, Dr., Universidade Federal de São Carlos Departamento de Química, C.P. 676, CEP 13560-970, São Carlos, SP, camargo@ufscar.br

³Físico, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, clovis@cnpdia.embrapa.br

⁴Médico Veterinário, MSc., consultor Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, anovaes@linkway.com.br

amostras o vácuo da câmara é quebrado, obriga-se um novo período de vácuo para o trabalho com a próxima amostra. Assim, deve-se evitar a troca frequente de amostras, a fim de diminuir o risco de contaminação na abertura da câmara e maximizar o tempo de uso do equipamento.

Uma opção para tanto é trabalhar com amostras diferentes simultaneamente na câmara, ou seja, inserir na mesma análise mais de uma amostra, permitindo que o vácuo seja mantido para a análise de ambas. Este objetivo não é trivial: demanda um sistema de manipulação preciso o suficiente para a deposição de amostras diferentes num espaço de cerca de 3 mm que é o tamanho padrão de uma grade porta-amostra de TEM, sem contaminação e com identificação capaz de ser reconhecida no trabalho de microscopia. Um sistema de micromanipulação com tais características foi desenvolvido na Embrapa Instrumentação Agropecuária, e descrito em documento anterior (um micromanipulador para embriões ou insetos) (NOVAES e BISCEGLI, 1997). A partir deste desenvolvimento, propôs-se neste trabalho a adaptação do sistema para uso na preparação de amostras de microscopia eletrônica de transmissão. O sistema de micromanipulação conseguiu trabalhar com até três amostras na mesma grade, sem risco de contaminação, e com visualização suficiente para garantia de qualidade das amostras preparadas. As amostras foram analisadas em TEM (Philips CM200), confirmando-se a capacidade de diferenciar as amostras dentro do equipamento e aplicar as diversas possibilidades de trabalho com a técnica.

Experimental

Sistema Micromanipulador

O sistema micromanipulador utilizado, visto em forma esquemática na Fig. 1 (a), foi construído de acordo com o sistema proposto por Novaes e Biscegli (1997). O sistema consiste de uma plataforma em acrílico polido, com niveladores; duas cantoneiras em acrílico são utilizadas para fixação de micropipetas ou outros instrumentos, que é feita em haste perpessante à lateral da cantoneira e afixada por arruelas. As cantoneiras são afixadas sobre a plataforma polida com graxa de silicone, permitindo assim que os instrumentos sejam deslocados no plano xy de forma suave e sem vibração. A movimentação no eixo z é feita pelo deslocamento da haste perpessante no rasgo lateral da cantoneira. O sistema é posicionado sob um microscópio de baixo aumento (50 a 100 vezes, Carl Zeiss), acoplado a uma câmera digital (MiniDV Sony DCR-HC28).

Neste trabalho optou-se por avaliar o preparo de amostras para TEM através da deposição de suspensões coloidais. Neste procedimento utilizou-se um micropipetador comercial (0,1 a 2,5 l) ligada a uma micropipeta de vidro de 50 µm de diâmetro (ponta), fabricada de acordo com a descrição de Novaes e Biscegli (1997). A micropipeta foi afixada na primeira cantoneira e conectada ao micropipetador por uma mangueira de plástico.

Foram utilizadas grades porta-amostra de Cu, com recobrimento de carbono (Ted Pella, Pelco 100 mesh). Para melhor manipulação, as grades foram suportadas num acessório em acrílico, com um furo superior de 2,9 mm, como indicado na Fig. 1 (b). A grade foi afixada por encaixe com a parte inferior do suporte, de forma a não danificá-la no manuseio.

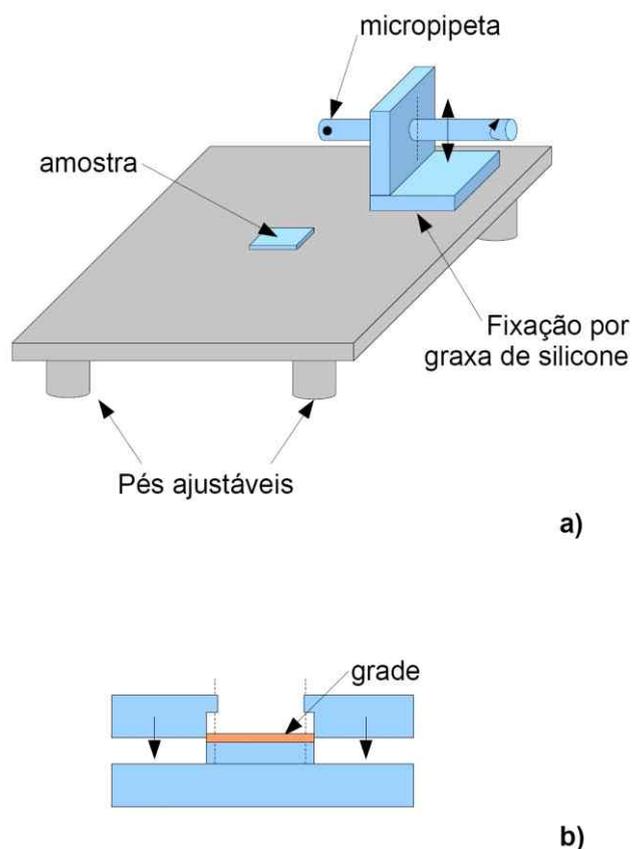


Fig. 1 - Esquema da montagem do sistema micromanipulador: a) visão esquemática do conjunto da plataforma com niveladores e cantoneira para fixação de instrumentos; b) visão esquemática do suporte para a grade porta-amostras.

Amostras

Foram escolhidas quatro amostras para validação do sistema: nanopartículas de PT (PbTiO_3), obtidas de acordo com a metodologia proposta por Camargo e Kakihana (2001); nanopartículas de TiO_2 comercial (Aeroxide P25, Degussa, 20% rutilo, 80% anatase); nanopartículas de prata (Ag), obtidas de acordo com a metodologia proposta por Camargo et al. (2007); e nanopartículas de SnO_2 , obtidas segundo a rota proposta por Niederberger e Garnweitner (2006). As duas primeiras amostras foram obtidas em pó, e redispersas em água deionizada por agitação em banho ultrassônico por 5 minutos, formando um colóide; as demais foram sintetizadas em meio líquido: a amostra de nanopartículas de prata em meio aquoso e as nanopartículas de SnO_2 dispersas em álcool benzílico. As duas amostras foram diluídas numa razão 10:1 partes de solvente: partes da suspensão, e agitadas em banho ultrassônico por 5 minutos.

Todas as amostras foram depositadas na grade segundo o mesmo procedimento: uma gota do colóide disperso foi depositada na grade, mantida por 30 segundos e retirada por absorção através de uma haste de algodão fina, afixada na segunda cantoneira. Desta forma, apenas a fração de nanopartículas na interface entre a gota e o porta amostra é transferida, garantindo a dispersão das partículas e a boa visualização.

Foram preparados dois conjuntos de amostras: uma grade com três amostras (nanopartículas de PbOTiO_3 , TiO_2 comercial e prata) e uma grade com duas

amostras (nanopartículas de SnO_2 e prata), observando-as no microscópio eletrônico de transmissão. Foi verificada a capacidade de diferenciar as amostras no equipamento, a obtenção de padrão de difração de elétrons e microanálise (EDX) e a formação de imagem em campo claro, campo escuro e alta resolução, definindo-se desta forma se o procedimento adotado de preparação de amostras foi capaz de produzir amostras de boa qualidade.

Resultados e Discussão

A Fig. 2 mostra uma visão geral do sistema micromanipulador sob o microscópio óptico. O sistema foi inicialmente ajustado posicionando-se a micropipeta visualmente sobre a grade porta-amostra. A Fig. 3(a) mostra a visão sob o microscópio óptico da grade, onde são identificados facilmente os quadrantes da grade, e uma variação do desenho, como melhor visualizado na Fig. 3(b), que indica o centro da grade. Na imagem, também é vista a camada de suporte amorfa ao fundo (polímero recoberto com carbono). Este ponto pode ser identificado no microscópio eletrônico de transmissão, favorecendo a identificação das regiões.



Fig. 2 - Visão geral do sistema micromanipulador com grade porta-amostra. (Créditos: Antônio Pereira de Novaes)

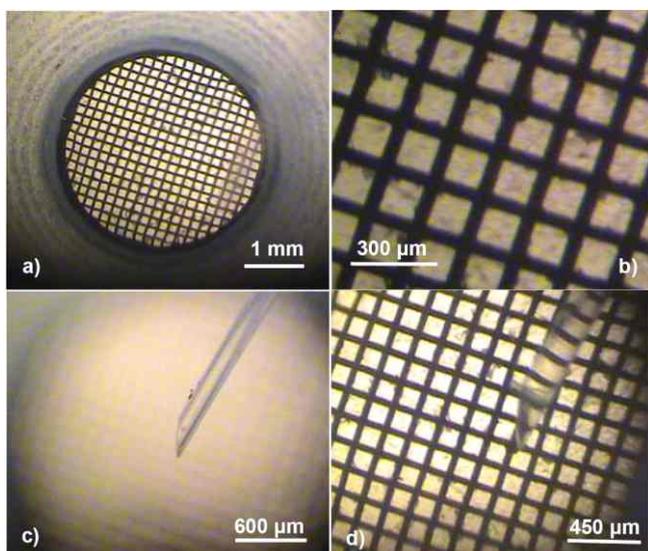


Fig. 3 - Visão geral sob o microscópio óptico: a) grade porta amostra e b) detalhe do centro da grade; c) micropipeta de vidro e d) visão da aproximação da micropipeta com a grade. (Créditos: Antônio Pereira de Novaes)

A micropipeta pode ser observada alterando-se o foco (Fig. 3(c)), porém, o posicionamento correto deve ser feito em condições nas quais o foco na grade e na micropipeta seja satisfatório simultaneamente (Fig. 3(d)). Essa condição inviabiliza a deposição da gota nessas dimensões sem o uso do micromanipulador: pequenas variações na altura são suficientes para danificar a grade porta-amostra, especialmente o recobrimento que dá a efetiva sustentação às partículas para observação.

A formação da gota para deposição é feita ajustando-se o foco especificamente na micropipeta. Pela observação feita na Fig. 4(a), foi formada uma gota de aproximadamente 1 mm de diâmetro (0,5 l), e depositada na grade ajustando-se paulatinamente a descida da micropipeta e o foco, de forma que a transferência acontecesse no primeiro contato com a grade (Fig. 4(b)). Pela imagem, nota-se que a gota cobriu entre 30 a 40 aberturas da grade, que é uma área de deposição suficiente para obtenção de uma amostra bem sucedida. Após 30 segundos, foi feito o procedimento de aproximação da haste de algodão (Fig. 4(c)) e a absorção da gota (Fig. 4(d)). Neste tamanho de gota os efeitos de capilaridade são bastante pronunciados, de forma que a remoção por absorção foi rápida e completa.

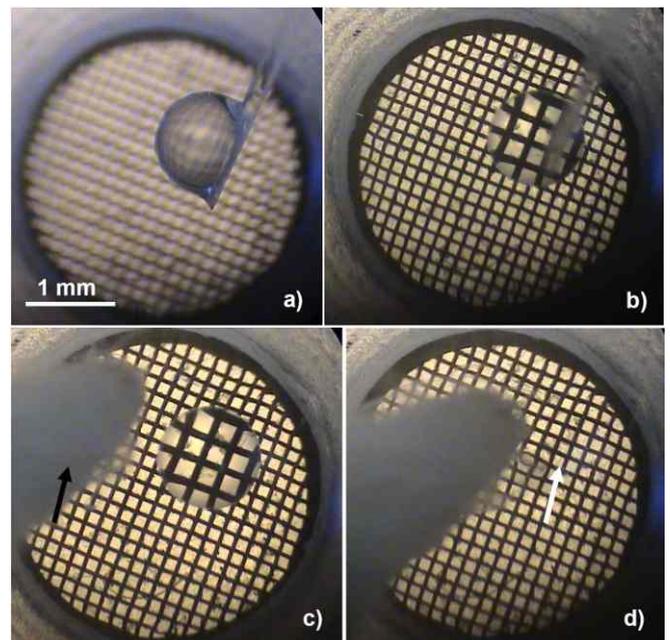


Fig. 4 - Etapas de deposição da gota na grade porta-amostra: a) formação da gota na micropipeta b) aproximação e transferência da gota por contato; c) aproximação da haste de algodão (destacada pela seta) e d) remoção do excedente. (Créditos: Antônio Pereira de Novaes)

A Fig. 5 mostra o primeiro conjunto de amostras observado. A visão geral em baixo aumento (Fig. 5(a)) confirma ser possível identificar a ocorrência de amostras em regiões específicas com maior densidade, como indicado pela seta branca na Fig. 5(a). Note-se que as regiões superiores e à direita não contém quantidades apreciáveis de amostras, indicando que a região demarcada é uma das áreas mais externas em contato com a gota inicial. Note-se também que, pela curvatura das aberturas à direita, a região identificada corresponde a uma das laterais da grade, o que era esperado.

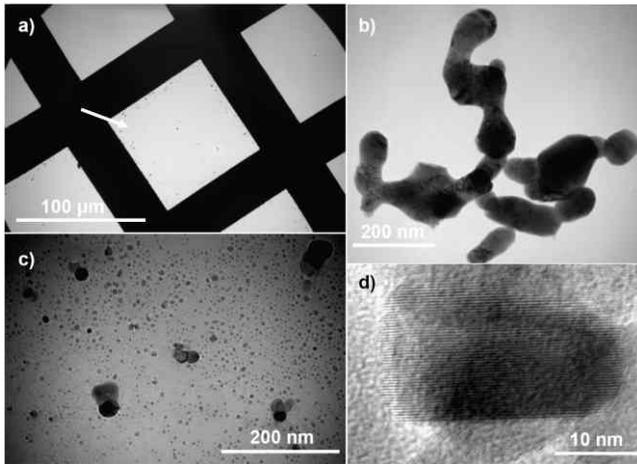


Fig. 5 - Amostras depositadas na mesma grade de TEM: a) visão geral da distribuição de amostras nos espaços de observação no microscópio eletrônico de transmissão; b) amostra de PT, imagem em campo claro; c) amostra de Ag, imagem em campo claro; d) nanopartícula isolada de TiO_2 , imagem em alta resolução. (Créditos: Caue Ribeiro).

A Fig. 5(b) mostra partículas de PT superpostas, em imagem de campo claro. Apesar do tamanho das nanopartículas (algumas da ordem de 100 nm), a dispersão é boa, indicando que a técnica de preparação de amostras conseguiu dispersar as partículas para observação. A Fig. 5(c) mostra um conjunto de nanopartículas de Ag com distribuição bimodal. A boa dispersão permite inclusive a quantificação de tamanhos de partícula, por contagem. É importante notar que não são identificadas partículas com o hábito morfológico das de PT, o que indica a boa separação entre amostras visualmente. Na Fig. 5(d), é observada uma nanopartícula de TiO_2 em alta resolução, de tamanho 20 nm, com clara identificação dos planos cristalográficos e boa separação das demais amostras.

As amostras na grade foram identificadas primeiramente por meio de espectroscopia de dispersão de energia de raios X (EDX), acoplada à câmara do microscópio, por meio da diferença de composição química das amostras. Este procedimento mostrou-se viável para condições onde as amostras apresentam elementos químicos distantes, como foi o caso deste conjunto (PT, TiO_2 e Ag); no entanto, pode não ser adequado para condições onde as linhas de emissão dos elementos constituintes são próximas. A Tabela 1 mostra as linhas de emissão de raios X principais (K 1 a L 2) para os elementos Pb, Ti, Sn e Ag, que demonstram que a identificação é possível neste conjunto de amostras.

Tabela 1: Linhas de emissão de Raios X para os elementos Pb, Ti, Sn e Ag

Elemento	K 1	K 2	L 1	L 2
Ti	4.51084	4.50486	4.93181	0.4522
Ag	22.16292	21.9903	24.9424	2.98431
Sn	25.2713	25.0440	28.4860	3.44398
Pb	74.9694	72.8042	84.936	10.5515

Como observado na Tabela 1, a diferenciação entre Sn e Ag não é muito favorável, ainda que possível. Esta dificuldade de identificação pode ser contornada, no segundo conjunto de amostras, por meio do padrão de difração de elétrons das estruturas como visto na Fig. 6. A estrutura na Fig. 6(a) é identificada como um conjunto

razoavelmente alinhado de nanopartículas de Ag, com orientação preferencial na $\langle 111 \rangle$, como identificado no padrão de difração. O padrão indica dois conjuntos orientados na mesma direção, que também pode ser verificado na imagem em campo claro como duas zonas de intensidade diferente. Selecionando-se o ponto mais intenso no padrão para a imagem em campo escuro (Fig. 6(b)) pode-se diferenciá-la como correspondente à parte superior da amostra, provavelmente uma nanopartícula primária.

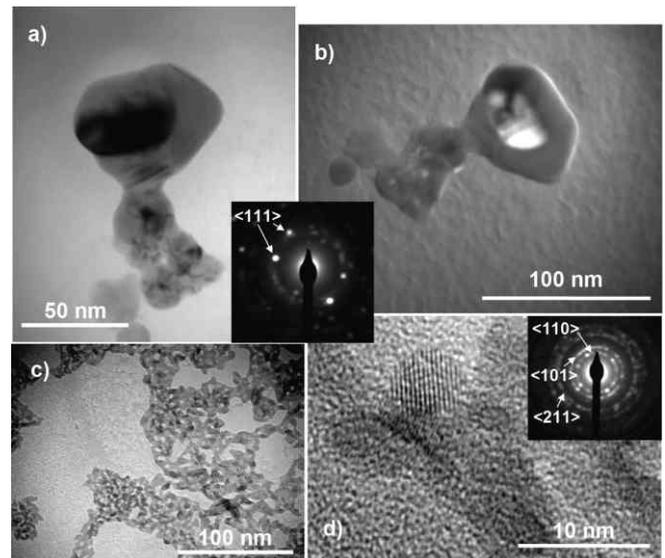


Fig. 6 - Amostras depositadas na mesma grade de TEM: a) nanopartículas coalescidas de Ag, em imagem em campo claro; b) a mesma região anterior, imagem em campo escuro. No detalhe entre as imagens, padrão de difração de elétrons da estrutura; c) visão geral de nanopartículas de SnO_2 ; d) nanopartícula isolada de SnO_2 em alta resolução. No detalhe à direita, padrão de difração das nanopartículas em (c) e (d). (Créditos: Caue Ribeiro)

A Fig. 6(c) mostra visão geral das nanopartículas de SnO_2 . Novamente, a dispersão entre as partículas é boa, permitindo mesmo na imagem em campo claro boa identificação dos tamanhos. Particularmente, as nanopartículas de SnO_2 aqui utilizadas são um caso mais complexo por estarem abaixo de 5 nm em diâmetro como visto na Fig. 6(d) o que dificulta inclusive a identificação visual na grade. O padrão de difração, visto à direita, identifica claramente três conjuntos de planos do SnO_2 , formando um semicírculo característico de amostras cristalograficamente polidispersas. No entanto, a identificação de partículas isoladas, como a da Fig. 6(d), é possível com excelente definição.

Considerações Finais

Este trabalho descreveu uma metodologia para obtenção de amostras para microscopia eletrônica de transmissão utilizando-se um micromanipulador, originalmente para trabalho com embriões, para deposição controlada de mais de uma amostra na mesma grade de suporte, permitindo a diminuição de trocas de amostra em sistemas que demandam vácuo. Os resultados demonstraram ser possível depositar, sem risco de danificar o suporte nem de contaminação cruzada, duas e três amostras de diferente composição na mesma grade.

Toda a sequência de caracterizações típica de microscopia eletrônica de transmissão (amostras em campo claro, campo escuro, padrão de difração de elétrons e espectroscopia de dispersão de energia de Raios X) pode ser executada, garantindo-se a identificação segura de cada amostra e boa separação entre elas, de forma que possam ser tratadas independentemente. Os resultados assim demonstram uma alternativa simples e confiável de minimização do tempo de troca de amostras e da perda de vácuo, o que garante (principalmente para instituições que não dispõem do microscópio, trabalhando normalmente em subcontratação) um uso melhor e mais confiável do equipamento. Os resultados, como demonstrados, podem ser estendidos para outras técnicas de microscopia, como microscopia eletrônica de varredura ou microscopia de força atômica.

Referências

- BRUS, L. Electronic wave-functions in semiconductor clusters - experiment and theory. **J. Phys. Chem.**, Ithaca, v. 90, p. 2552560, 1986.
- CAMARGO, E. R.; KAKIHANA, M. Peroxide-based route free from halides for the synthesis of lead titanate powder. **Chem. Mater.**, Washington, v. 13, p. 11811184, 2001.
- CAMARGO, E. R.; LEITE, E. R.; RIBEIRO, C. Efeito do pH na síntese de uma dispersão coloidal de nanopartículas de prata utilizando o ácido cítrico como agente redutor. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30.; REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBQ, 2007. p. T1431-1 2
- KAMAT, P. V.; MEISEL, D. Nanoscience opportunities in environmental remediation. **Comptes Rendus Chimie.**, [S. l.], v. 6, n. 8-10, p. 9991007, ago. 2003.
- LEITE, E. R. Nanocrystals assembled from bottom-up. In: NALWA, H. S. (Ed.). **Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology**. 1st ed. Valencia, CA: American Scientific Publishers, 2004. p. 537550.
- NIEDERBERGER, M.; GARNWEITNER, G. Organic reaction pathways in the nonaqueous synthesis of metal oxide nanoparticles. **Chem.Eur. J.**, Weinheim, v. 12, n. 28, p. 72837302, set. 2006.
- NOVAES, A. P.; BISCEGLI, C. I. **Novo sistema de micromanipulação**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1997. (Circular Técnica, 6).
- WANG, Z. L. Transmission Electron Microscopy and Spectroscopy of Nanoparticles. In: WANG, Z. L. (Ed.). **Characterization of nanophase materials**. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. p. 3780.
- ZHANG, G. et al. Synthesis and characterization of mesoporous ceria with hierarchical nanoarchitecture controlled by amino acids. **J. Phys. Chem. B, Condens. matter surf. interfaces biophys.**, Washington, v. 110, n. 51, p. 2578225790, 2006. ISSN 1520-6106.

Comunicado Técnico, 82

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 3374 2477
Fax: 16 3372 5958
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
www.cnpdia.embrapa.br

1a. edição
1a. impressão 2007: tiragem 300

Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Revisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Valentim Monzane