

CARACTERIZACIÓN DE ORGANISMOS BIOLÓGICOS A TRAVÉS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

CHARACTERIZATION OF BIOLOGICAL ORGANISMS THROUGH ELECTRONIC MICROSCOPY

Juan David Cañón Bermúdez¹

observable.

Keywords: electronic microscope, biological samples, morphological analysis.

RESUMEN

La microscopia electrónica es una técnica de caracterización que permite alcanzar escalas de medida en nanómetros. Este microscopio tiene la capacidad de analizar muestras principalmente conductoras, pero en el análisis de muestras biológicas es indispensable hacer un recubrimiento el cual permita que al momento del análisis morfológico no se generen concentraciones de carga eléctrica que imposibiliten su observación; para ello nuestra pregunta de investigación consiste de determinar cuáles son las condiciones adecuadas de tratamiento de la muestra para que esta sea fácilmente observable.

Palabras clave: microscopio electrónico, muestras biológicas, análisis morfológico.

ABSTRACT

Electron microscopy is a characterization technique that allows to reach measurement scales in nanometers. This microscope has the ability to analyze mainly conductive samples, but in the analysis of biological samples it is essential to make a coating which allows that at the time of the analysis no electric charge concentrations are generated that make it impossible to observe them; for this our research question consists in determining what are the appropriate treatment conditions of the sample so that it is easily

INTRODUCCIÓN

La invención del microscopio ha posibilitado una serie de descubrimientos a nivel científico que han concedido el avance de la ciencia; en la actualidad el microscopio más utilizado es el microscopio óptico, el cual funciona a partir de la luz visible para crear una imagen aumentada de la muestra (Nieto, 2010). El poder resolutivo de los microscopios ópticos puede verse favorecido al utilizar luz ultravioleta y el uso de aceite de inmersión con elevado índice de refracción cubriendo la lente del objetivo y la muestra. En general el poder de resolución está en función de la longitud de onda de la luz, razón por la cual su capacidad de aumentos es limitada dejando aún muchas posibilidades de exploración. Con la invención del microscopio electrónico de barrido (SEM) se logran mayores amplificaciones debido a que este funciona con un cañón de electrones que permite obtener menores longitudes de onda permitiendo obtener mucha más información de la muestra, y aumentando el número de amplificaciones del microscopio electrónico el cual puede alcanzar el orden de 300000x (Lozano, Yañez, & Morales, 2014). El microscopio electrónico utiliza electrones en lugar de luz para formar la imagen y aunque el microscopio electrónico posee mayor capacidad de aumentos a comparación del microscopio óptico, al analizar muestras biológicas se presentan varios inconvenientes (Salas, 2014):

¹ Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), Tecnoacademia Risaralda, Laboratorio de Nanotecnología. Centro de Comercio y Servicios.davidcanber@gmail.com

a) La humedad presente en organismos biológicos puede contaminar la columna del microscopio y b) Los electrones que llegan a la muestra pueden no ser reflejados hacia el detector lo que imposibilitaría su observación, esto debido a que los electrones pueden generar un exceso de carga en determinadas zonas de la muestra por lo que solo se observarían ciertos destellos o iluminaciones en la pantalla de observación.

Muchas investigaciones ofrecen diferentes protocolos de tratamiento de la muestra para mejorar la resolución de la imagen, lamentablemente la mayoría de estas técnicas no evitan los problemas antes mencionados, es por esta razón que el objetivo de la investigación es determinar si la aplicación de un recubrimiento de un material conductor sobre la muestra biológica a analizar, puede mejorar la capacidad de resolución y el número de aumentos por microscopía electrónica de barrido.

METODOLOGÍA

El creciente interés en la nanotecnología y en las técnicas de recubrimiento delgados de nuevos materiales ha permitido el desarrollo de nuevas aplicaciones tecnológicas. Una de las técnicas más utilizadas se conoce como Deposición física en fase de vapor (PVD por sus siglas en inglés) esta técnica permite recubrir una variedad amplia de superficies con diferentes tipos de materiales y cuyo espesor fabricado está en el rango de nanómetros a micrómetros permitiendo obtener un recubrimiento uniforme con poca pérdida de material durante el proceso (Egidi, Mendive, Corengia, & Quinteiro, sf).

Para mejorar el análisis de muestras biológicas se procedió a recubrir una hormiga (Formicidae), una abeja (Anthophila) y polen utilizando la cámara de recubrimientos PVD - Sputter Coater Cressington 108 Auto (Figura 1) – depositando una capa delgada de oro de alta pureza (99%) para aumentar la conductividad eléctrica de la muestra evitando de esta forma las concentraciones de carga eléctrica (Sánchez, 2006). Las condiciones del recubrimiento fueron las mismas para ambos especímenes. Utilizando la

bomba de vacío se logró una presión interna de 0,5mbar, corriente eléctrica durante el proceso de 40mA con un tiempo de recubrimiento de 40s y la distancia intercatodos fue de 50mm.

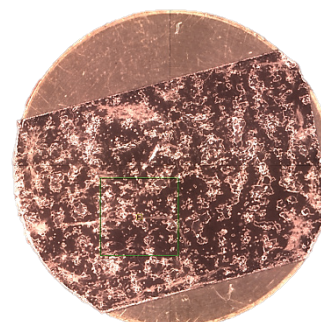
Figura 1. Sputter Coater Cressington 108 Auto.



Fuente . Autor (2017)

Existen unos soportes especiales de superficie circular donde se colocan las muestras. Éstas deben estar convenientemente adheridas a dicho soporte, para ello se suele emplear una cinta de carbono (para hacerla conductora) con doble cara adhesiva. Si se utiliza otro tipo de adhesivo, éste debe ser: conductor, no gasificar en vacío, de fácil uso y rápido secado. Una vez colocada la muestra, si no es conductora será necesario recubrirla con una capa conductora. La muestra fue puesta en un pin de aluminio y fijada con cinta de carbono (Figura 2), la cual permite servir de medio conductor para evitar la concentración de carga. Posterior al tratamiento de las muestras, se procedió a sus análisis por microscopía electrónica.

Figura 2. Muestra biológica fijada con cinta de carbono y recubierta con oro.



Fuente . Autor (2017)

Las imágenes fueron analizadas en un microscopio electrónico PHENOM X-PRO (Figura 3), con una energía de barrido de 15eV a diferentes magnificaciones (Phenom, 2015). Esta técnica de recubrimiento de muestras facilitó el análisis de muestras biológicas, permitiendo a la vez tomar

Figura 3. Microscopio electrónico de barrido (SEM), Marca Phenom ProX.



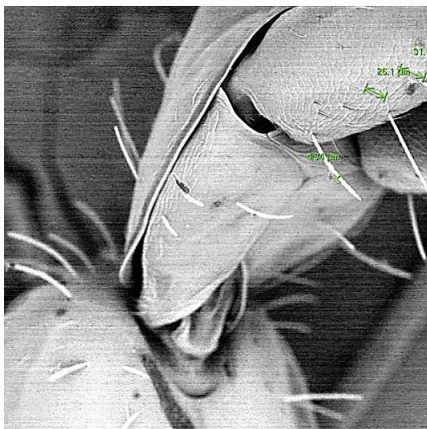
Fuente . Fuente: Autor (2017)

medidas en escalas de micrómetros y nanómetros que facilitan el análisis de los especímenes.

RESULTADOS

Las imágenes obtenidas por el microscopio electrónico de barrido Phenom ProX de la Tecnoacademia Risaralda, después del tratamiento de los especímenes, muestran una alta resolución a diferentes alcances de las diferentes muestras orgánicas: A continuación se muestran las imágenes obtenidas: En la figura 4 se observa una hormiga a 450X, en esta imagen se hicieron medidas de longitud de diferentes vellosidades,

Figura 4. Hormiga a 450X

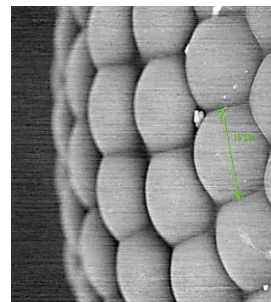


Fuente . Autor (2017)

el total de estas, en la escala de micrómetros de longitud.

En la figura 5 se observa el ojo compuesto de la hormiga a 2950X, determinado por una gran cantidad de pequeños ojos que lo componen, allí se analizó la medida de unos de ellos, encontrándose un valor de longitud de 15μm.

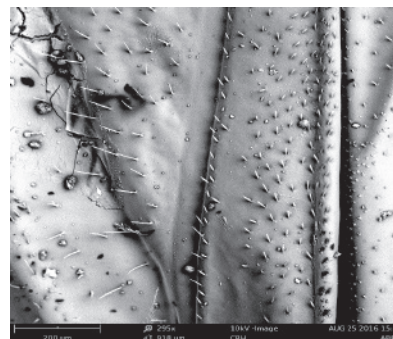
Figura 5. Ojos de la hormiga a 2950X.



Fuente . Autor (2017)

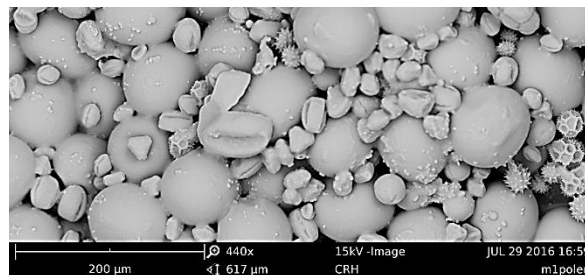
En la figura 6 observamos una abeja a 295X aumentos y en la figura 6 una muestra de polen a 440X.

Figura 6. Abeja a 295X



Fuente . Autor (2017)

Figura 7. Polen a 440X



Fuente . Autor (2017)

CONCLUSIONES

La técnica Deposición física en fase de vapor (PVD) en modo Sputtering DC resulta una herramienta útil, en muchos casos la única disponible, para recubrir materiales biológicos con una capa delgada de material conductor que permita el análisis de texturas de las muestras, de manera no destructiva. En este trabajo se ha demostrado su utilidad en la caracterización de diferentes organismos biológicos sin la pérdida de resolución.

Casi todas las muestras de materiales orgánicos, cerámicos y polímeros suelen ser no conductoras, por lo que su observación con electrones es difícil o imposible debido a la acumulación de carga que se produce en su superficie. La acumulación de carga produce una zona de carga espacial que produce zonas blancas excesivamente brillantes durante la observación.

Una capa conductora de unos 1-100 nm de espesor de elementos como: Cobre, Aluminio, Oro, paladio, suele ser suficiente para asegurar una buena observación. Esta capa puede aplicarse con un evaporador PVD por el método de Sputtering. En esta investigación se demostró que el oro es un material que permite hacer un recubrimiento que permite la fácil observación de muestras biológicas.

nom-World BV.

Salas, R. (2014). *Estudio de materiales nanométricos con microscopio*. Chihuahua: CIMAV.

Sánchez, J. M. (2006). *Deposición de capas constituyentes de estructuras multicapa con funciones controlables eléctricamente*. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Egidi, D. A., Mendive, C. B., Corengia, P. A., & Quinteiro, M. O. (sf). Deposición de películas delgadas por PVD y su caracterización mediante AFM.

Lozano, V., Yañez, M. J., & Morales, A. (2014). *Principios y práctica de la microscopía electrónica*. Mexico: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) .

Nieto, M. G. (2010). *Fundamentos en la preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido*. Chiapas: Ecosur.

Phenom. (2015). *User Manual Phenom ProX*. Phenom-World BV.