

# Preparo de filmes-suporte para microscópio eletrônico

por

**Eduardo Penna - Franca e Clotilde Paci**

## *Considerações gerais*

Preparações para microscópio eletrônico devem ser montadas sobre películas muito finas, que por sua vez têm como suporte discos perfurados ou rêdes metálicas. Nos Estados Unidos é generalizado o emprego de rêdes ou grades de 200 malhas por poleg.<sup>2</sup>, construídas com fios de aço inoxidável trançados, de cêrca de 50 micra de diâmetro, formando malhas quadradas de 80 micra de lado. Estas malhas recobertas pela película, constituem o campo de observação para o microscópio eletrônico.

As membranas para serem utilizadas devem apresentar as seguintes qualidades:

a) Não possuïrem mais de  $300 \text{ \AA}$  de espessura para evitar absorção exagerada de elétrons.

b) Serem suficientemente resistentes para suportar o seu próprio pêso e o dos espécimens, bem como as operações de montagem, secagem, "shadow casting", etc.

c) Serem constituídas de material de baixo pêso molecular, de modo que a absorção da película seja uma fração muito pequena do fluxo total de elétrons.

d) Possuïrem grande homogeneidade e nenhuma estrutura, mesmo quando observadas com os maiores aumentos.

e) Resistirem ao bombardeio eletrônico e ao seu conseqüente aquecimento.

Não existem membranas ideais que satisfaçam integralmente a todos êsses requisitos, em muitos pontos antagônicos.

As que têm sido empregadas até hoje, com maior ou menor êxito, podem ser assim grupadas:

filmes de plásticos orgânicos: nitroceluloses (parlódio, colódio), polivinilos (formvar)

filmes de óxidos — Si O, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

filmes metálicos — Be e Al de 20 a  $30 \text{ \AA}$  de espessura.



## PELÍCULAS

### Filmes de Parlódio e Formvar

As membranas de parlódio e formvar têm pequena absorção e são bastante homogêneas. O seu emprêgo é o mais generalizado, em virtude da facilidade de sua preparação, e são satisfatórias para grande número de trabalhos comuns. O seu inconveniente maior é a pequena resistência ao aquecimento, o que faz com que se fendilhem e acabem sendo destruídas numa observação prolongada.

Num microscópio de baixa voltagem, como o de que dispomos, (R. C. A. tipo E M C-2 de 30 KV) êste defeito releva de importância, pois, devido à menor velocidade dos elétrons, o seu tempo de permanência no interior da película, ao atravessá-la, é maior, e o aquecimento muito grande. Os filmes de parlódio, por isso mesmo, após poucos segundos de exposição, começam a se tornar vacuolados, e se rompem facilmente. Os filmes de formvar resistem um pouco mais, porém apresentam maior estrutura.

Para podermos trabalhar com mais sucesso num microscópio de 30 KV, procuramos preparar películas mais resistentes ao aquecimento e que, ao mesmo tempo, fôsem muito homogêneas e possuíssem transparência não muito inferior às de parlódio.

Nossa atenção se voltou para os óxidos metálicos.

### Filmes de $Al_2O_3$

Examinamos as técnicas para a preparação destas películas por oxidação anódica de fôlhas finas de Al e dissolução posterior do metal em  $Hg Cl_2$ . (1-2-3).

Verificamos as concentrações ótimas, analisamos os diversos meios de dissolução do Al e chegamos a um método que nos permite obter boas películas, desde que se disponha de fôlhas de Al muito puro e de superfície extremamente polida. Estas condições são dificilmente satisfeitas pelo Al que normalmente se pode obter em nosso meio.

Só conseguimos películas bastante homogêneas e sem estrutura considerável com Al diretamente recebido da Alemanha.

O filme é muito resistente ao calor e aos agentes químicos, e muito transparente, mas, normalmente, só pode ser empregado para espécimens que não ofereçam perigo de confusão com a estrutura da película, como sejam diatomáceas, partes de insetos, etc.

### Filmes de SiO

Evaporizando-se uma mistura equimolecular de  $SiO_2 + Si$  em alto vácuo, obtém-se um pó castanho, fino, de fórmula Si O (4).

HASS G. e KEHLER H. (2) foram os primeiros a empregar Si O para o preparo de filmes para difração eletrônica. MOLLENSTEDT (5) usa sílica para o mesmo fim.



HEIDENREICH e PECK (6-7) preparam réplicas de superfície metálicas evaporizando  $\text{SiO}_2$  sobre réplicas negativas de polistireno, prensado a quente sobre o metal, e dissolvendo posteriormente o plástico em brometo de etila.

BAKER e NICOLL (8) utilizam para o mesmo fim uma reação de hidrólise do  $\text{SiCl}_4$ , como fonte de vapores de  $\text{SiO}_2$ , que são condensados sobre uma réplica negativa de polistireno.

O Si O é mais aconselhável que o  $\text{SiO}_2$ , em preparações feitas para o microscópio eletrônico por evaporação em alto vácuo, em virtude de atacar menos os suportes de tungstênio ou tântalo onde são aquecidos, e também porque requer menores temperaturas para se volatilizar.

Em nosso laboratório evaporizamos Si O, em alto vácuo, sobre filmes finos de parlódio montados sobre as rêdes do microscópio eletrônico.

Em seguida, submetemos as mesmas a um aquecimento lento em placa aquecedora de resistência elétrica e, observando o efeito sob microscópio ótico, verificamos que o parlódio pode ser eliminado por evaporação, ficando a película de Si O intacta.

O contrôle da velocidade de aquecimento é muito importante para evitar fragmentações.

Rêdes contendo somente membrana de parlódio mostram-se completamente limpas quando aquecidas até  $200^\circ\text{C}$  por volatilização total.

Os filmes de Si O sobre parlódio mantêm-se até temperaturas superiores a  $250^\circ\text{C}$  sem alteração.

As películas obtidas são muito resistentes ao bombardeio eletrônico, de ótima transparência, de homogeneidade superior às de parlódio, sua maior falha residindo na facilidade com que se rompem, quando se secam sobre elas gotículas d'água na montagem dos espécimens.

São indicadas para montagens a seco, ou nos casos em que se deseje grande transparência e resistência ao calor, quando se poderá fazer a preparação a úmido com cuidado, e aproveitar as malhas que não se fragmentarem durante a secagem.

A solução que nos pareceu mais simples e indicada para os trabalhos comuns em microscópio de baixa tensão, como o que possuímos, e que provavelmente será muito promissora nos de maior tensão, foi a das películas de SiO justapostas às de parlódio.

Operamos como no caso anterior, utilizando, porém, uma quantidade menor de SiO, e aproveitamos diretamente êsses filmes duplos para a montagem dos espécimens, sem a eliminação do parlódio.

Essas membranas têm resistência aos elétrons e ao aquecimento menor que as de SiO puro, porém muito superior às de parlódio e formvar; são mais homogêneas, e a sua transparência é muito pouco inferior.



A preparação é relativamente simples, podendo-se utilizar para a evaporação do SiO ou SiO<sub>2</sub> as instalações de alto vácuo para "shadow casting".

### Preparações sem filmes

Fumaças contendo certos tipos de partículas, como óxidos metálicos, ou negro de fumo, por exemplo, são capazes de formar, quando incidindo sobre as rês-suporte do microscópio eletrônico, aglomerados de cristais muito pequenos em torno dos fios metálicos, que podem assim ser observados.

JOHN L. WATSON (9) verificou que se conseguem melhores resultados captando estas partículas em fibras de borracha, lã de vidro ou asbesto, de cerca de 1 micron de diâmetro, ou menos, montadas sobre rês, ou mesmo sobre a pequena capa metálica do porta-espécimen do microscópio eletrônico. No primeiro caso, as fibras ficam presas apenas pela pressão da capa, porém no segundo devem ser soldadas com cimento de borracha (Dunlop rubber cement).

Devido à dificuldade em obtermos estas fibras, tentamos outra solução, que agora nos parece mais simples e rápida.

Durante os nossos ensaios para a preparação de filmes de SiO, verificamos o efeito do aquecimento lento sobre películas de parlódio montadas sobre rês.

Pelo controle com microscópio ótico, notamos que a cerca de 190°C a película começa a se romper bruscamente, aglomerando-se, e formando fios que cruzam as malhas em direções diversas.

Aproveitamos então essas fibras de parlódio como suportes para partículas capazes de formar cadeias ou aglomerados em torno das fibras.

Nestas condições, as partículas são observadas livres no espaço, sem filme, ganhando-se grande aumento em contraste e nitidez.

O processo é indicado para partículas de baixo peso molecular, que, portanto, têm absorção fraca, muito próxima à dos filmes-suporte usuais. Partículas coloidais, bem como cristais solúveis, podem ser montados facilmente pela deposição de uma gota de solução sobre a rês com fibras, e posterior secagem.

### TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO

Damos a seguir as técnicas de preparação dos diversos tipos de películas, com as modificações por nós introduzidas:

#### 1 — Filmes de Parlódio

Empregamos 2 processos:

- a) por espraiamento sobre água.
- b) por espalhamento sobre vidro (cast film)



a) Sobre um suporte metálico cilíndrico, de cerca de 2 cm de altura, depositado no fundo de um cristizador de vidro, de 20 cm de diâmetro, coloca-se um vidro de relógio com a face convexa para cima.

Enche-se de água destilada até cobri-lo e põem-se sobre a sua superfície 10 a 20 rédes-suporte do microscópio eletrônico. Satura-se a água com acetato de amila, deixando evaporar o excesso que se acumula na superfície.

Por meio de um conta-gotas, deixa-se cair uma gota de solução de parlódio a 1,5% em acetato de amila, sobre a água. Em virtude de imiscibilidade dos dois líquidos, há um espraiamento da solução de parlódio, com formação de uma película muito fina, que vai ocupar toda a superfície livre da água.

A espessura do filme depende sobretudo da concentração do parlódio, e verificamos que soluções mais fortes que 1,5%, vão dar membranas que absorvem muito, e se aquecem demasiado sob o bombardeio eletrônico, rompendo-se mais facilmente. Concentrações menores dão películas muito finas, demasiado frágeis, que se quebram mesmo durante a montagem e secagem.

Deixa-se evaporar o solvente por alguns minutos, verificando-se, pelo desaparecimento das cores de difração, que a película já está seca.

Sifona-se então a água por meio de um tubo recurvado, de modo a permitir que o filme decante sobre o vidro de relógio, contendo as grades. A face convexa deste facilita a aderência.

Retira-se o vidro de relógio, deixa-se secar ao ar, ao abrigo de poeira, ou melhor, sob o calor de uma pequena lâmpada.

Quando secas, as grades podem ser facilmente destacadas com uma pinça, e estão prontas para a montagem dos espécimens.

Estas películas são muito transparentes, bastante homogêneas, mas quebram-se facilmente sob a ação dos elétrons. São empregados por nós para posterior recobrimento com SiO.

Certos tipos de espécimens podem ser incorporados à solução de parlódio, antes de se preparar a película pelo processo indicado. As partículas ficarão no final, englobadas no filme. Com isto, perde-se um pouco de contraste na observação, mas o processo se presta para preparações, sobretudo minerais, que possuam grande absorção, e não necessitem de "shadow casting".

b) Sobre uma lâmina de vidro, quimicamente limpa com sulfo crômica, ou melhor, com detergente, e polida com óxido de magnésio (11), deixam-se escorrer gotas de uma solução de 0,5% de parlódio em álcool-éter (3:1). Mantém-se na posição vertical até secagem completa.

Por meio de uma lâmina gilete, inicia-se o descolamento da película na sua parte inferior, onde, devido ao acúmulo de parlódio durante a secagem, a espessura é maior.



A lâmina é então introduzida numa cuba com água, num ângulo de incidência pequeno, de modo que a extremidade destacada do filme flutue. Tomando-se cuidado para não molhar a face superior da película, vai-se mergulhando lentamente, até que a mesma se solte por completo, permanecendo na superfície da água. (5)

Com uma tesoura afiada corta-se o filme em pedacinhos pequenos, de cerca de 5 mm de lado, e sobre cada um deles deposita-se uma rede, com a parte lisa para baixo.

As grades, com as membranas sobrepostas, podem ser retiradas d'água, colocando-se sobre elas, pequenas tiras de papel de jornal, que é o mais indicado. Quando úmidas, mas não encharcadas, as fitas são retiradas, trazendo consigo as redes.

Seca-se ao ar ou sob lâmpada.

Um bom indício de espessura conveniente da película é a ausência de cores de difração, e a verificação de aderência perfeita à rede, após a secagem.

Êstes filmes foram preparados por nós, sem o polimento do vidro com óxido de magnésio, e apresentam, por isso bastante estrutura, mas se prestam para montagem de espécimens não muito pequenos, que não apresentem perigo de confusão com as irregularidades da mesma. São bem mais resistentes ao bombardeio eletrônico que os do tipo anterior.

A maior vantagem que apresentam é a possibilidade de deposição dos espécimens a serem montados como uma suspensão aquosa, com posterior secagem, sobre a lâmina de vidro onde se vai preparar a película.

Procede-se como já descrito, e no final o filme trará incorporados os objetos que desejamos observar.

## 2 — Filmes de Formvar

Podem ser preparados por processos análogos aos de parlódio.

Para espraçamento sobre água empregamos solução a 1% em dicloro etileno.

Estas soluções devem ser guardadas ao abrigo da luz e renovadas de tempos em tempos, porque o solvente vai se decompondo e os filmes obtidos serão então muito frágeis (5).

Para preparo sobre vidro, SCHAFFER e HARKER (11) indicam solução a 0,5% em dioxano, ao passo que SCHUSTER e FULLAN (10) preferem a 0,2 a 0,4% em dicloro etano.

## 3 — Filmes de $Al_2O_3$

Preparam-se por oxidação anódica de folhas de alumínio, em solução de citrato de amônia a 3%, empregando-se catodo de grafite, e dissolução posterior de Al em cloreto mercúrio a 0,25%.



A espessura da película é função da voltagem aplicada. Quando se fecha o circuito, a corrente sobe ao máximo, para logo cair rapidamente até zero, em virtude da camada isolante de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  que se vai formando. 8 a 10 volts dão uma boa espessura e de resistência suficiente.

Procede-se como se segue:

Lava-se o Al com  $\text{HNO}_3$  a 10% a  $80^\circ\text{C}$  um minuto, para limpeza de óxido e outras impurezas, e em seguida com água.

Eletrolisa-se com 8 a 10 volts.

Lava-se com água.

Recorta-se em pedacinhos de cerca de  $3\text{ mm}^2$ , e coloca-se em solução de  $\text{HgCl}_2$ , a 0,25%, de maneira a que flutuem.

Espera-se cerca de 20 minutos até que os filmes de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  se destaquem.

Com uma espátula transferem-se os mesmos para uma placa com água destilada, para lavagem.

Com as rédes do microscópio eletrônico pescam-se os filmes e deixa-se secar.

Estão prontos para a montagem e, dependendo da qualidade do Al, podem-se obter películas muito boas por este processo.

#### 4 — Filmes de SiO

a) Filmes de SiO sobre parlódio.

As películas de parlódio a 1,5%, em acetato de amila, preparadas por espraçamento sobre água, são utilizadas como base para o filme de SiO.

Um ímã em U, com 2 pequenas barras de aço adaptadas a seus pólos, de modo a distarem uma da outra poucos milímetros, formando uma ranhura onde se podem colocar 20 a 25 rédes, recobertas com parlódio, é utilizado para sustentá-las no alto da campânula do conjunto de alto vácuo.

Para a evaporação do SiO (ou  $\text{SiO}_2$ ), utilizamos processo análogo ao de "shadow casting". O SiO é colocado sobre pequena lâmina de tântalo, através da qual podemos fazer passar uma corrente variável de cerca de 50 a 100 A, sob uma tensão máxima de 15 volts.

O vácuo é feito por uma bomba rotativa acoplada a uma outra de difusão a óleo, de modo a conseguirmos uma pressão inferior a 0,1 micron de Hg.

Para o controle da quantidade de SiO vaporizado, a melhor técnica é a indicada por HEINDENREICH (6), de pesagem, para cada vez, de uma porção determinada, e volatilização completa. Esta massa de SiO é função da distância vertical que separa a lâmina de aquecimento da réde.

Em nossa instalação, para uma altura de 6 cm, empregamos 1 mg de SiO de cada vez, para montagens comuns, e 1,5 mg, para espécimens relativamente grandes.



b) Filmes de SiO puro.

Rêdes com filmes de parlódio a 1,5% em acetato de amila, recobertos por 1,5 mg de SiO evaporizado, são colocadas em lâminas de vidro, e aquecidas sôbre placa aquecedora de resistência elétrica.

Eleva-se a temperatura até 170°C e em seguida lentamente (3°C/min.) até 250°C, mantendo-se neste estado 10 minutos. Desliga-se e deixa-se resfriar naturalmente.

Controla-se no microscópio ótico para rejeitar as rêsdes que ocasionalmente apresentem filmes fragmentados.

O processo conduzido em estufa não dá bons resultados, pela impossibilidade de um contrôle preciso da temperatura.

### 5 — Preparações sem filme, com fibras de Parlódio

Preparam-se películas de parlódio a 2,5% em acetato de amila por espraçamento sôbre água. Seca-se sob lâmpada e colocam-se as rêsdes sôbre lâmina de vidro, que é aquecida em placa aquecedora de resistência elétrica, dotada de termômetro e reostato.

Eleva-se a temperatura até 150°C e em seguida lentamente até 188°C, mantendo-a por cêrca de 10 minutos. Durante êste último intervalo, retiram-se grades para contrôle em microscópio ótico. Quando as malhas se apresentam com poucos fios finos cruzando tôda sua extensão, cessa-se o aquecimento e deixa-se esfriar naturalmente. A temperatura exata até onde se deve levar o aquecimento depende muito das condições particulares em cada caso, devendo, pois, ser determinada para cada tipo de aparelhagem. Situa-se, porém, em tórno de 190°C para parlódio de procedência americana.

**AGRADECIMENTO** — Queremos deixar aqui consignados os nossos agradecimentos pela colaboração do Prof. HANS MUTH, chefe do laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz, que orientou os nossos primeiros passos, e muito nos auxiliou durante todo o curso dêste trabalho.

**NOTA** — As fotografias do texto foram realizadas com chapas velhas, já bastante defeituosas, e por isso, se apresentam manchadas e pontilhadas, o que muito prejudica a sua nitidez. As grandes dificuldades atuais de importação impediram-nos de receber chapas novas, a tempo de realizarmos êste trabalho.

### SUMMARY

Working with low voltage microscope (R.C.A., EMC-2, of 30KV.) the authors verified that Parlodion and Formvar films are quickly destroyed by intense heating under the electron beam. They have tried to employ oxide films, as Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and SiO, more resistant to heat.



Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> films are prepared by anodic oxidation of thin aluminium sheets, under 8 to 10 volts in a 3% ammonium citrate solution and subsequent aluminium dissolution in a 0.25% HgCl<sub>2</sub> solution.

These films are very suitable when prepared with highly pure aluminium of extremely homogeneous surface.

Best results were obtained with SiO films, evaporated in high vacuum over Parlodion films mounted on metallic grids.

Employing 1 or 1.5 mg of SiO, highly homogeneous and resistant films are obtained, having little inferior transparence than the Parlodion ones.

Pure SiO films (1.5 mg) are obtained by elimination of the Parlodion under slow heating until 250°C; they are greatly transparent but little resistant to water, thus being indicated in dry preparations.

For particles which deposit in a chain-like form around thin fibers, the authors employ the mounting on Parlodion fibers, obtained by heating Parlodion films on microscope grids about 190°C.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1 — MAHL, H. — Chem. Abst. 34 — 2557 — 1940.
  - 2 — HASS KEHLER — Chem. Abst. 35 — 7821 — 1941.
  - 3 — ZWORYKYN e RAMBERG — J. Appl. Phys. 12 — 692 — 1942.
  - 4 — FLUSIN — L'Industrie chimique — 9 — 321 — 1942.
  - 5 — WYCKOFF, RALPH W. G. — Electron Microscope — Interscience publishers N. Y. — 1949.
  - 6 — HEINDENREICH e PECK — J. Appl. Phys. 14 — 23 — 1943.
  - 7 — HEINDENREICH e PECK — Phys. Rev. 62 — 292 — 1942.
  - 8 — BAKER e NICOLL — J. Appl. Phys. 15 — 805 — 1944.
  - 9 — WATSON, JOHN L. — J. Appl. Phys. 17 — 121 — 1946.
  - 10 — SCHUSTER e FULLAN — Ind. and Eng. Chem. 18 — 653 — 1946.
  - 11 — SCHAFFER e HARKER — J. Appl. Phys. 13 — 427 — 1942.
-



### ESTAMPA 1

Fig. 1 — Fragmento de diatomácea sôbre filme de parlódio obtido por espalhamento sôbre uma lamina de vidro onde se haviam depositado e secado gotas da suspensão de diatomáceas.

Ampliação microscópica	5000 X
” fotográfica	2 X
” total	10000 X

Fig. 2 — Filme de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  obtido com fôlha de Al não muito puro e apresentando estrutura que se pode notar na fotografia.

Ampliação microscópica	5000 X
” fotográfica	1,7 X
” total	8500 X



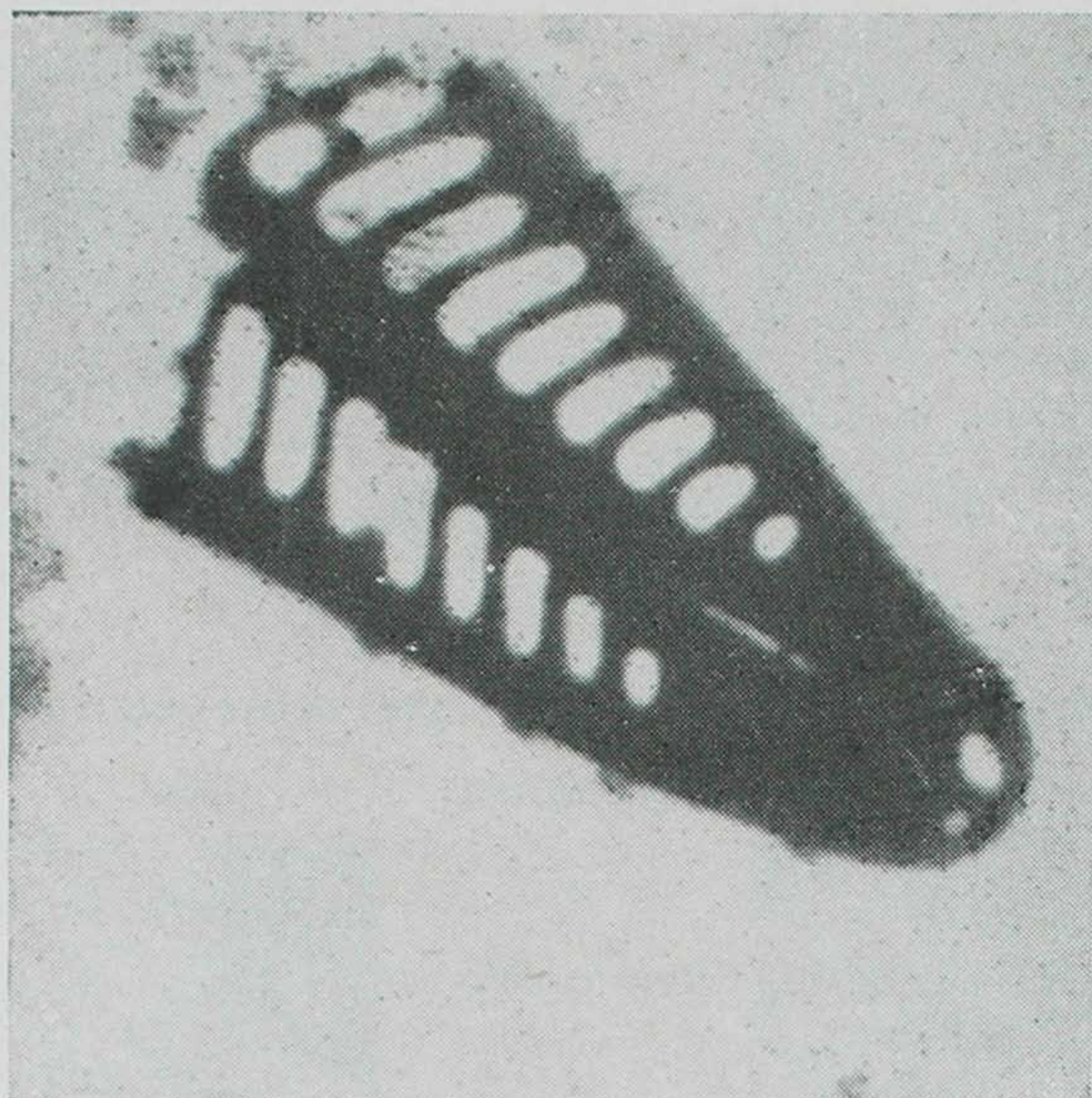


Fig. 1

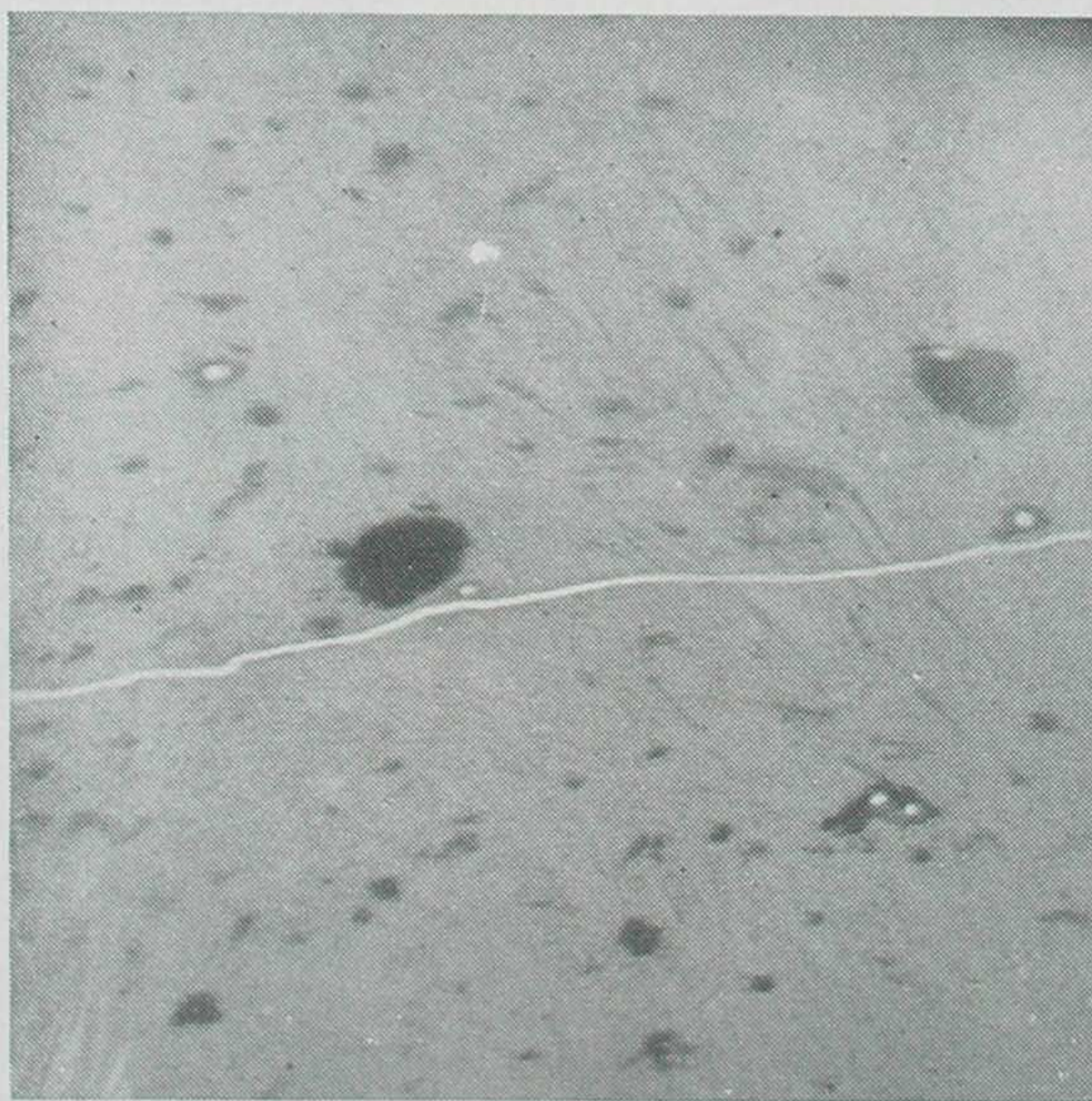


Fig. 2

*Penna-Franca e Paci: Filmes-suporte para microscópio eletrônico*



ESTAMPA 2

Fig. 3 — Bactéria sobre filme de SiO, 1 mg, sobre parlódio 1,5%.

Ampliação microscópica 5000 X

Fig. 4 — Detalhe da cauda de um espermatozóide de sapo sobre filme de SiO, 1 mg e parlódio 1,5%.

Ampliação microscópica 5000 X

Fig. 5 — Resíduo de parlódio parcialmente volatilizado por aquecimento insuficiente a 220°C. sobre filme de SiO 1,5 mg.

Ampliação microscópica 5000 X

Figs. 6 e 7 — Cristais de ZnO sobre filme de SiO de 1,5 mg.

Ampliação microscópica 5000 X

Fig. 8 — Negro de fumo obtido por combustão de cânfora, aglomerado em torno de fio de parlódio.

Ampliação microscópica 5000 X





Fig. 3



Fig. 4

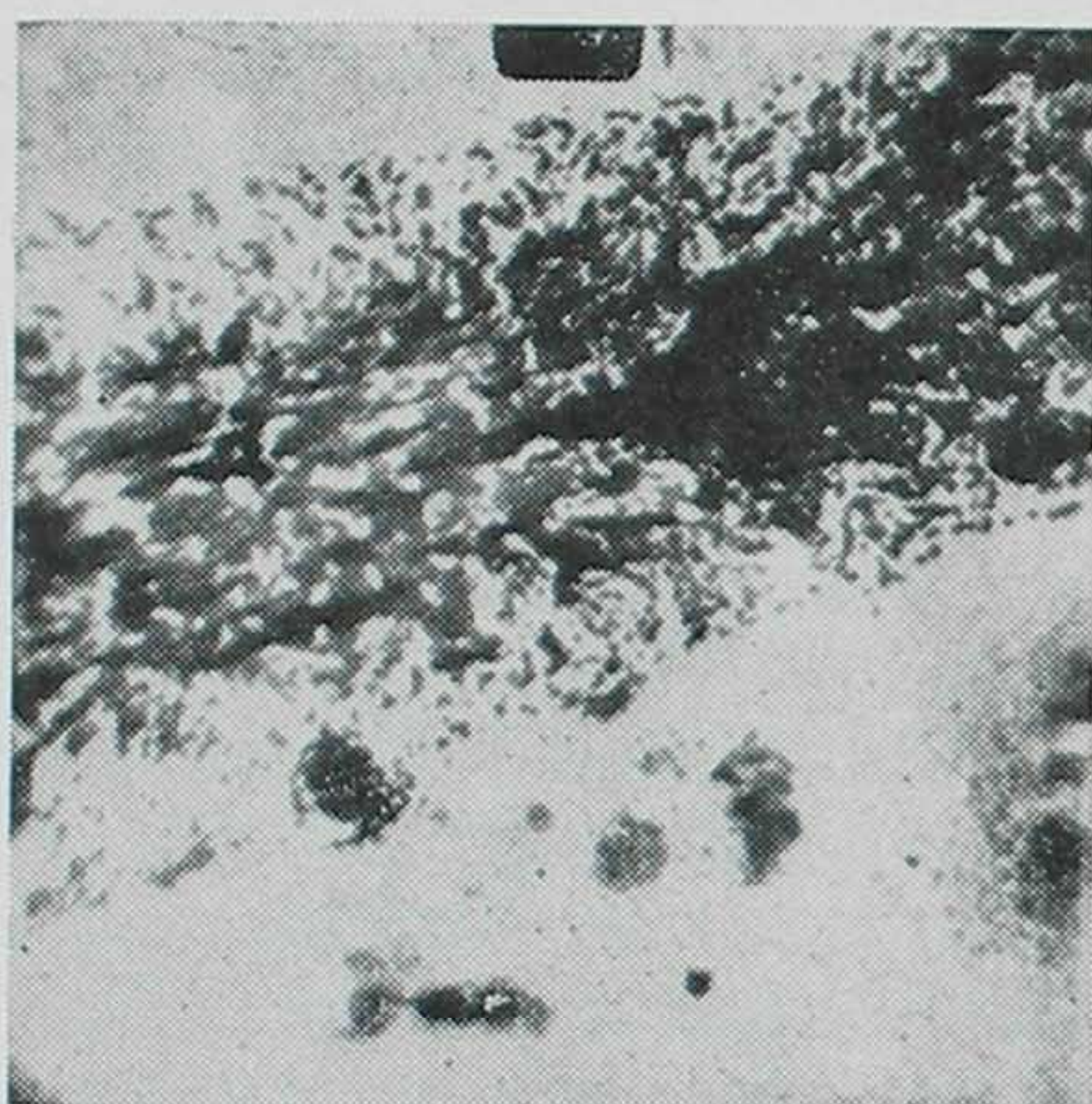


Fig. 5

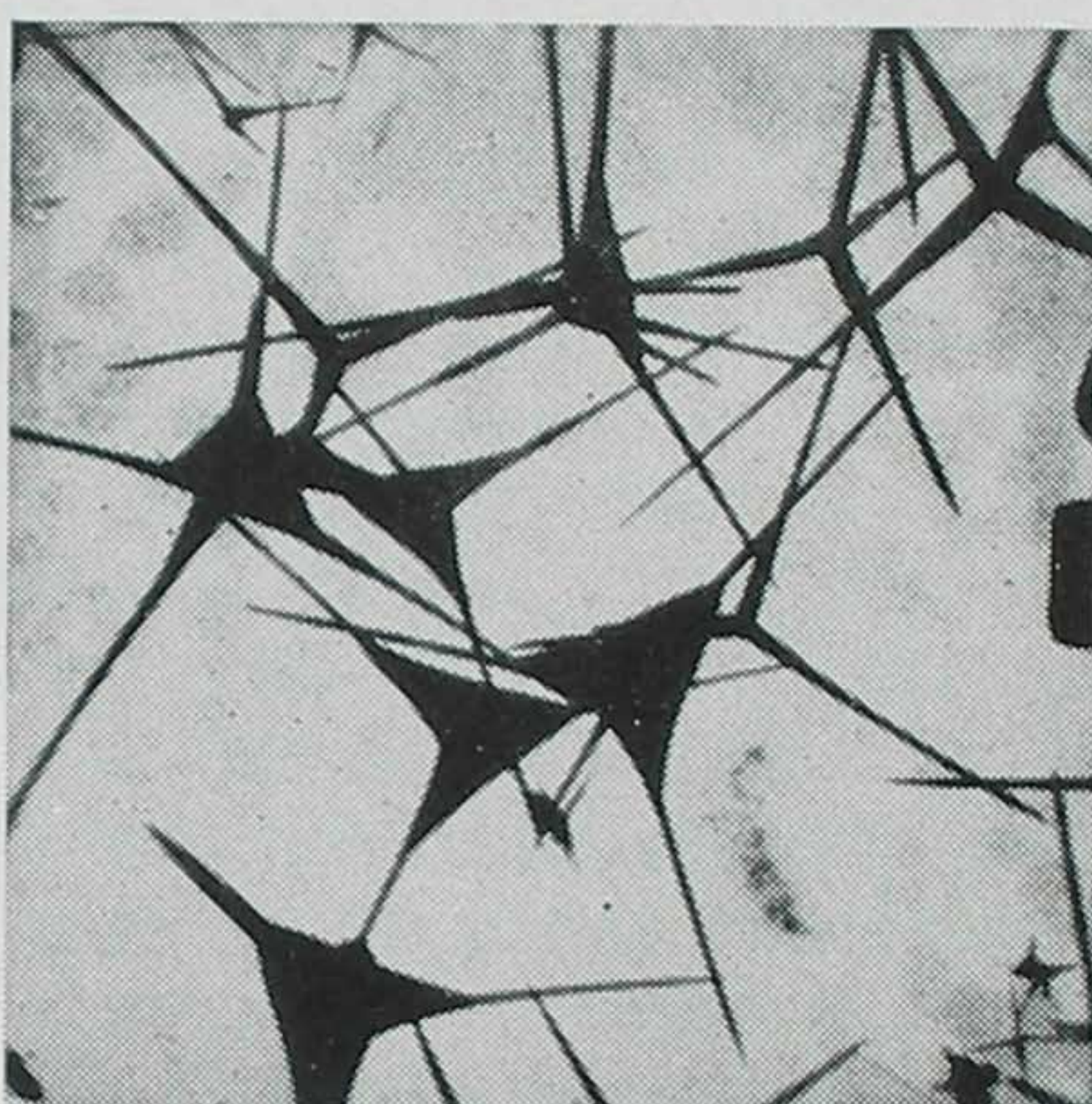


Fig. 6

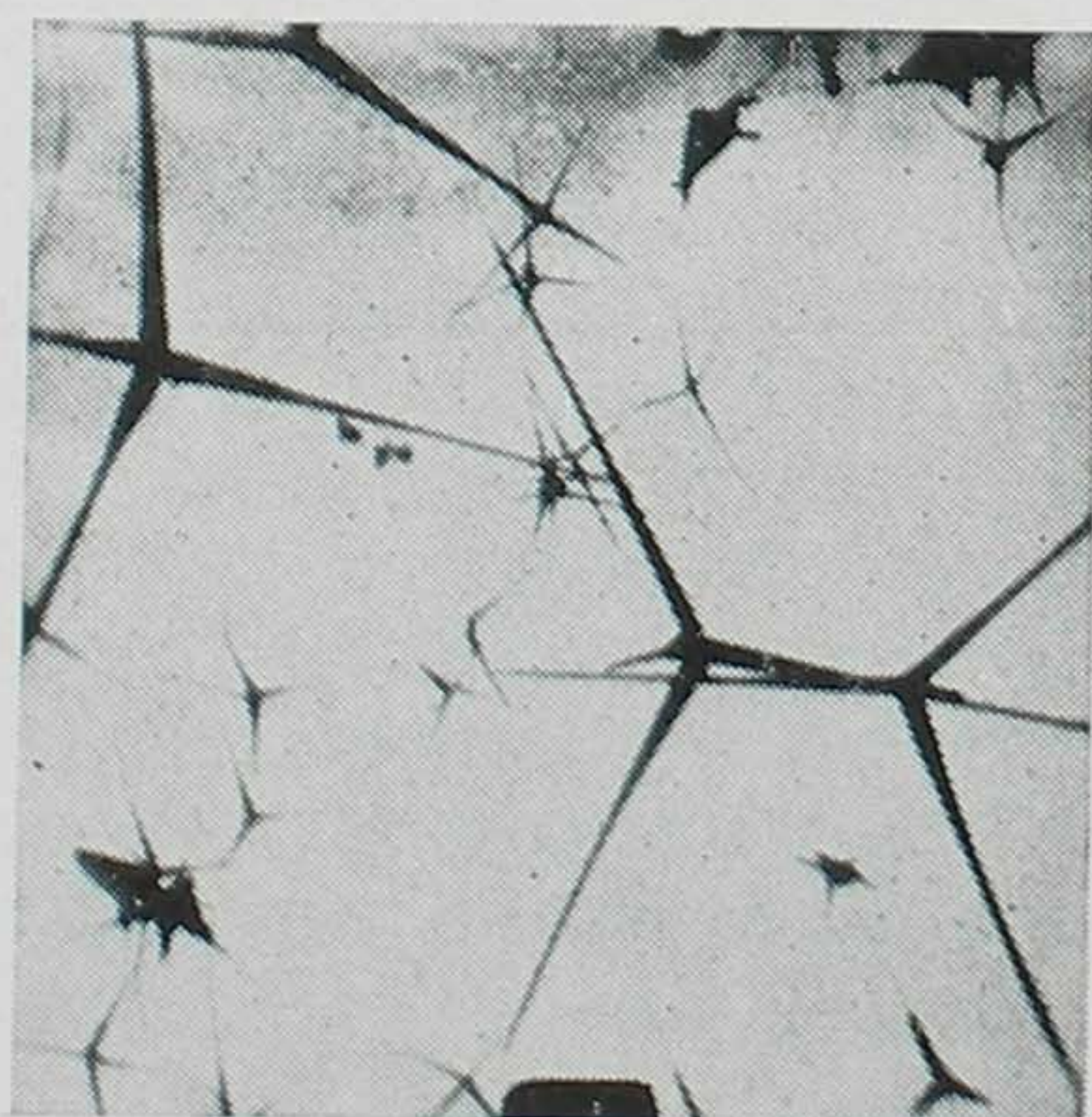


Fig. 7



Fig. 8