



FUNDAMENTOS EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA  
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

M.C. María Guadalupe Nieto López



Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido



Tapachula, Chiapas, México.

Junio 2010

## INTRODUCCIÓN A LA MICROSCOPIA

### Tamaño celular:

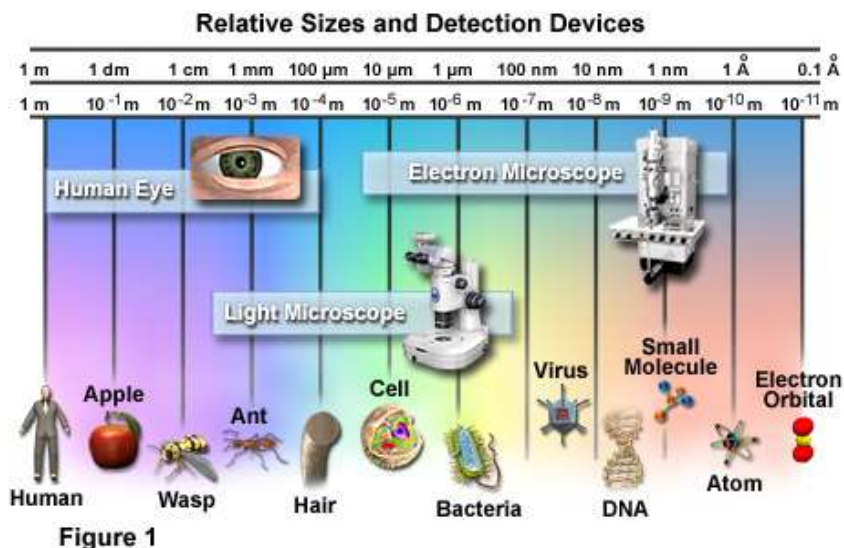
Las células son las unidades básicas de los seres vivos. La mayoría de ellas son de pequeño tamaño por lo que es indispensable el uso de instrumentos como los microscopios para su visualización.

Los microscopios aumentan el poder resolutivo del ojo humano. La resolución se refiere a la habilidad del microscopio de poder distinguir dos objetos (puntos) muy juntos ( $\times$  distancia) como entidades separadas en lugar de un solo objeto. Entre más pequeña es la distancia (entre los dos objetos) que el microscopio puede distinguir, mejor es su resolución.

Por lo general el poder resolutivo del ojo humano es de 0.2 mm (200  $\mu$ m), o sea la menor distancia vista o resuelta por el ojo humano es de dos líneas separadas 0.5 mm de distancia; si hay dos líneas a 200  $\mu$ m de distancia, veremos una sola línea.

La invención del microscopio en el siglo XVII permitió la serie de descubrimientos posteriores de las mismas. En 1665 Robert Hooke utilizando un microscopio óptico simple, examinó un corte de corteza, encontró que esta estaba compuesta por una masa de diminutas cámaras, que llamó "células", en realidad sólo vió las paredes celulares, ya que este tejido está muerto a la madurez y las células ya no tienen contenido. Más tarde, Hooke y algunos de sus contemporáneos observaron células vivas.

Existen dos tipos básicos de microscopios: ÓPTICOS y ELECTRÓNICOS.



## **Microscopio óptico (MO), resolución y aumento:**

El tipo de microscopio más utilizado es el microscopio óptico, que se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. Al emplear la luz visible como elemento de iluminación el objeto se observa con sus colores naturales.

El microscopio óptico más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta 15 veces.

Por lo general se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores.

El microscopio compuesto consiste en dos sistemas de lentes: el objetivo y el ocular, montados en extremos opuestos de un tubo cerrado. El objetivo está compuesto de varias lentes que crean una imagen real aumentada del objeto examinado. Las lentes de los microscopios están dispuestas de forma que el objetivo se encuentre en el punto focal del ocular. Cuando se mira a través del ocular se ve una imagen virtual aumentada de la imagen real. El aumento total del microscopio depende de las longitudes focales de los dos sistemas de lentes que por lo general dan como resultado un aumento total de 100, 400 y 1000 veces.

La mayor capacidad de los MO actuales es un poder resolutivo de  $0,2 \mu\text{m}$ , unas mil veces la del ojo humano.

Es posible mejorar esta resolución si se emplea como iluminación a la luz ultravioleta y si la lente objetiva y el espécimen están inmersos en un medio de elevado índice de refracción. Estas condiciones elevan la resolución hasta  $0.1 \mu\text{m}$ .

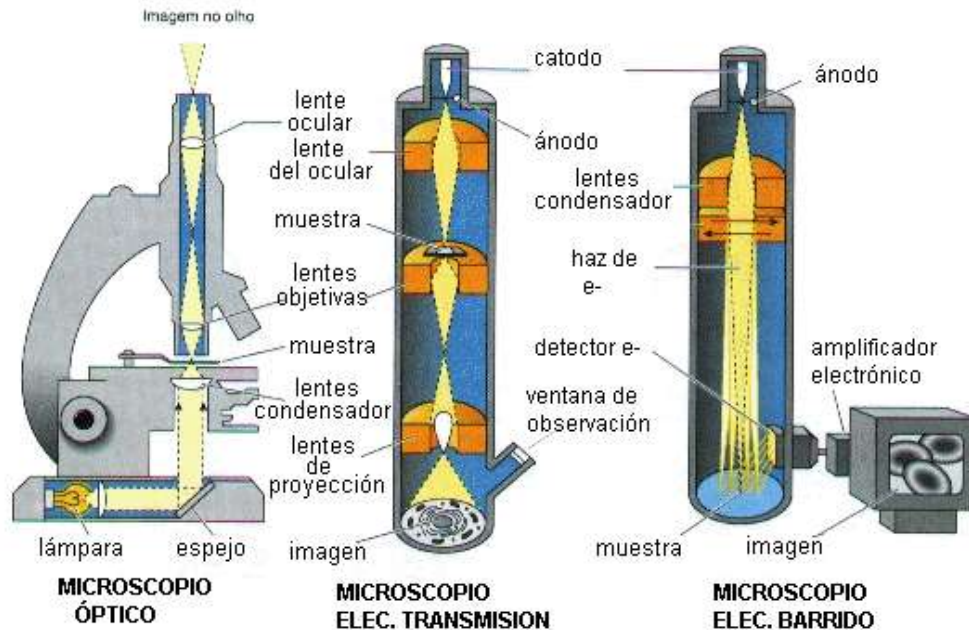
Los especímenes o muestras que se examinan con un microscopio son transparentes por lo general o cortados en rebanadas muy finas. Estos pueden observarse gracias a la luz que los atraviesa, y se suelen colocar sobre un rectángulo fino de vidrio. En ocasiones es necesario reforzar la visualización con el uso de colorantes.

La capacidad de aumento de un microscopio compuesto se calcula multiplicando el aumento del objetivo por la del ocular.

El poder de resolución está en función de la longitud de onda de la luz y es una propiedad innata de la lente que integra el objetivo denominada apertura numérica (medida de la capacidad de captación de la luz por la lente).

En general existe una correlación entre la capacidad de aumento ya la apertura numérica de una lente: lentes de gran capacidad de aumento poseen generalmente altas aperturas numéricas. El diámetro del objeto más pequeño que se puede resolver es de  $0.5 \lambda / \text{apertura numérica}$ , donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz que se utiliza.

En la siguiente imagen se detallan las similitudes que existen entre un microscopio óptico compuesto y los microscopios electrónicos.



## LOS PRINCIPIOS DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB)

El microscopio electrónico de barrido utiliza lentes electromagnéticas, sistema de vacío, aperturas y cañón de electrones. El MEB acelera los electrones y los colima para formar un haz muy fino que incide sobre la superficie de la muestra produciendo varias posibilidades de obtención de imagen.

Debido al tamaño pequeño de las aperturas y la longitud de onda de los electrones tan corta, se puede conseguir una gran profundidad de campo (por lo tanto mucho más información de la muestra) comparado con la imagen que se obtendría con un microscopio óptico si se usa el mismo aumento.

### La iluminación:

El microscopio electrónico de barrido (MEB) utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen.

El haz de electrones es producido al calentarse un filamento metálico dispuesto en el cañón de electrones, en la parte superior del microscopio. Cuando los electrones son liberados del átomo, se comportan de forma análoga a la luz. Este comportamiento es el que se aprovecha en la microscopía electrónica.

### Las lentes electromagnéticas:

El haz de electrones sigue una trayectoria vertical a través de la columna del microscopio y se dirige y enfoca sobre la superficie de la muestra a mediante un arreglo de lentes electromagnéticas.

Las lentes funcionan creando un campo electromagnético perpendicular a la dirección de la ruta del electrón haciéndolo que los rayos que tienden a dispersarse, se junten y se proyecten sobre un punto focal.

Al final de la trayectoria la última lente condensadora, denominada comúnmente en los MEB, lente objetivo, es la que sintoniza el haz de electrones para formar un punto o mancha muy fina. Ésta contiene dos juegos de bobinas deflectoras conectadas a un generador de rastreo para recorrer la superficie de la muestra doblando el haz sobre ejes x y y de forma ordenada. Se manera sincronizada, esta bobina deposita la señal en el tubo de rayos catódicos (TRC) del microscopio resultando una correspondencia de uno a uno entre la posición del haz sobre la muestra y la posición de la señal depositada en el TRC.

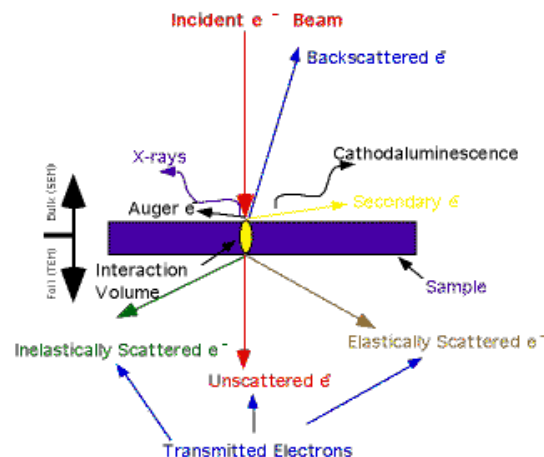
### El bombardeo de la muestra:

Cuando el haz de electrones (primarios) incide sobre la superficie de la muestra, provoca que otros electrones (retrodispersados y secundarios) sean proyectados de la misma.

Los detectores recolectan electrones secundarios o retrodispersados y los convierten en una señal que es enviada a una pantalla fosforescente, similar a la de una televisión, con esta señal se produce una imagen.

El haz primario también puede desprender electrones de las capas internas de las moléculas de la muestra los cuales al regresar a su estado nativo emiten energía en forma de rayos X. Estas energías pueden también ser recolectadas, identificadas y analizadas por detectores especiales para rayos X.

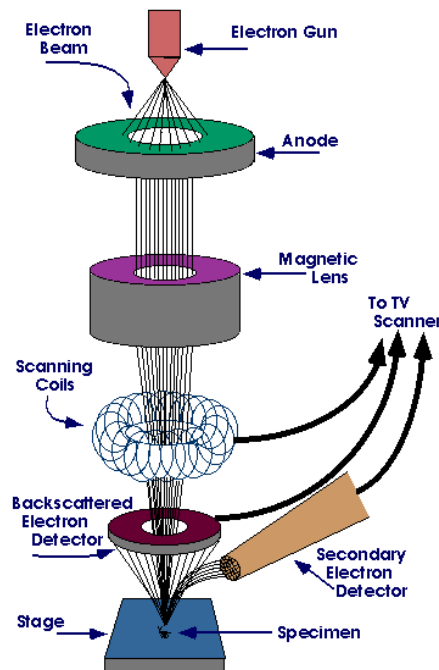
La muestra también puede absorber parte de los electrones primarios.



## Los detectores:

Los electrones secundarios son producidos por choques inelásticos de los electrones primarios con los átomos de la muestra. Estos electrones poseen baja energía, del rango de 0 a 50 eV; por su baja energía se asume que estos electrones son generados por las moléculas más superficiales de la muestra y son utilizados para generar imágenes tridimensionales al ser recolectados mediante un detector para electrones secundarios.

El detector de electrones secundarios está diseñado con una carga ligeramente positiva para atraerlos. El extremo del detector contiene sistema para hacer que los electrones secundarios atraídos golpeen una placa aluminizada acoplada a un material fosforescente que provoca que se forme una centella o chispa. Esta es convertida a su vez en un fotoelectrón después de chocar con un fotocátodo y así entra a un tubo fotomultiplicador que incrementará el tamaño de la señal hasta el orden de cien mil o un millón de veces.



## Las aperturas:

Durante su recorrido por la columna, el haz de electrones atraviesa una serie de aperturas de 1000 micras de diámetro, éstas tienen la función de eliminar los electrones periféricos y dejar pasar solo la parte central del haz.

En la lente condensadora final (lente objetivo), está dispuesta una serie de aperturas de diferente diámetro (30, 50, 100 y 200 micras para el MEB Topcon SM510). Las más pequeñas generan un punto o mancha más pequeño, con menos energía y es usada para generar una imagen de electrones secundarios; las más grandes generan una mancha mayor con un gran número de electrones, éstas

pueden dañar especímenes muy frágiles, son utilizadas para tener imágenes de electrones retrodispersados y hacer análisis de rayos X.

### **La muestra:**

La muestra está normalmente pegado a una base metálica (por lo general aluminio) y es aterrizado para evitar la estática por las cargas de alto voltaje cuando los electrones golpean la muestra. Es necesario orientar la muestra de manera precisa respecto a haz de electrones que inciden y el detector. Para ello se utilizan las funciones de movimiento en x, y y z e inclinación del microscopio.

### **El vacío:**

Mientras el MEB funciona, la columna y la muestra deben estar siempre al vacío, lo que significa que la mayoría de las moléculas de aire son removidas del interior del microscopio. La ausencia de moléculas en la ruta del haz, permite que éste viaje libremente y logre incidir sobre la muestra. El vacío también protege al filamento de que se funda.

El vacío en un microscopio se logra mediante la combinación de una bomba rotatoria que hace un vacío previo y una bomba de difusión de aceite que es mucho más potente. El sistema de vacío es controlado de forma totalmente automática y está protegido contra fallas de operación.

### **La profundidad de campo:**

Además de controlar el tamaño de la mancha y número de electrones que inciden finalmente sobre la muestra, las aperturas son empleadas para controlar la profundidad de campo en la muestra.

La profundidad de campo se refiere al espesor de la muestra aparece estar en foco. Por ejemplo una apertura de 100 micras, permite observar en foco hasta 4 mm del espesor de la muestra cuando se observa a un aumento de 10x, mientras que una apertura de 200 micras solo puede enfocar 2 mm.

La profundidad de campo también es afectada por la distancia a la cual la muestra es colocada respecto a las lentes objetivo (distancia de trabajo). A mayor distancia, mayor profundidad de campo.

### **El aumento:**

El haz barre un área rectangular de la muestra, ésta misma área es la que se visualiza en la pantalla por lo que el aumento obtenido es la relación del área de la imagen en la pantalla y el área de la superficie barrida. El aumento que se obtiene puede ser tan grande como 300, 000X.

### **La resolución:**

El diámetro del haz que enfoca la muestra (tamaño de la mancha) tiene un diámetro del orden de 4 a 500 nm. En principio este diámetro puede ser manipulado y repercute directamente en la resolución (a menor diámetro, mayor resolución, pero también la fuerza de la señal es menor). En la práctica, la resolución también depende de las propiedades del espécimen o muestra, de las técnicas de preparación y otras condiciones de trabajo del MEB (voltaje de aceleración, velocidad de barrido, distancia de trabajo, ángulo de incidencia).



## PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO



Siempre que existan trabajos publicados de estudios por MEB de una muestra en particular, es aconsejable seguir el mismo protocolo. Si no existiera esta información, se puede establecer un protocolo siguiendo los mismos fundamentos que para procesar muestras por MET (microscopía electrónica de transmisión), pues hay más literatura disponible para esta técnica.

La mayoría de las veces termina uno estableciendo su propio protocolo basándose en los criterios generales que se citan en la literatura. (Bozzola y Russell, 1992, Dykstra, 1992). Para ello, el interesado debe experimentar con su propia muestra y seguir estos criterios o experiencias reportadas en los artículos para establecer cual es la forma más adecuada para manipular, seleccionar y procesar su muestra.

Al ensayar por primera vez una muestra en particular, es aconsejable ensayar 2 ó 3 protocolos para definir el que dé mejores resultados.



A continuación se describen algunas generalidades y ejemplos de los pasos para preparación de muestras experimentadas en el LMEB de ECOSUR. El protocolo para la preparación de es algunas muestras está escrito y se proporciona al usuario para su ejecución.

## **LIMPIEZA DE MATERIALES Y REACTIVOS**

Es importante tener extremo cuidado con la limpieza del material y soluciones a utilizar durante el procesado de la muestra.

Se recomienda usar material de vidrio nuevo o limpio de apariencia y dejarlo remojando en una agua de detergente con cloro para eliminación de cualquier impureza orgánica, enjuagar al último con agua destilada, dejar secar en un lugar libre de polvo y guardar en un recipiente cerrado hasta su uso.

Las soluciones fijadoras, alcoholes y buffers deben ser filtrados después de su preparación utilizando filtros que retengan partículas finas o microfiltros si se dispone de ello.

Antes de usar cualquier solución es conveniente inspeccionar su transparencia agitándola y observándola a través de la luz, en las soluciones buffer suelen crecer fácilmente hongos. Todas estas partículas extrañas pueden adherirse a la superficie de la muestra y obstruir la observación de la zona de interés o dar lugar a malas interpretaciones de las imágenes.

Todas las pinzas, alfileres, pinceles, etc. Deben limpiarse con acetona y guardarlos protegidos del polvo.

## **SELECCIÓN DE MUESTRA**

### **Muestras frescas o vivas:**

Siempre que sea posible es mejor utilizar muestras recién obtenidas y conservadas en un medio inocuo hasta su inspección y preparación en el laboratorio.

Ej. Las muestras vegetales pueden colocarse en bolsas de papel o polietileno con una hoja de papel para y transportarse a temperatura ambiente o un medio fresco.

Los insectos es mejor mantenerlos en un recipiente con una tapa perforada o cubierta con malla fina.

Los cultivos microbianos es necesario mantenerlos en refrigeración o procesar de inmediato si se desea observar alguna fase particular de crecimiento.

En organismos acuáticos es aconsejable conservarlos en la misma agua donde fueron colectados dentro de un frasco en refrigeración.

En caso de órganos internos o parasitoides internos es necesario hacer las disecciones en un medio acuoso utilizando agua destilada o una solución buffer de fosfatos (SBF) pH 7.2-7.4.

### **Muestras ya capturadas y conservadas en alcohol o algún otro conservador:**

Muchas ocasiones el único material que se cuenta ya está conservado en algún otro medio, en este caso la única opción es seleccionar aquellos especímenes o partes que estén menos dañadas y más limpias. La inspección y selección debe hacerse bajo un microscopio estereoscópico.

Siempre que sea posible se utilizará un pincel para manipular la muestra o unas pinzas finas tomando la muestra por zonas que no serán exploradas. Cualquier daño o rasgadura no observable a simple vista o bajo el estereoscopio puede causar que la muestra se colapse durante su procesado posterior o interferir en la inspección de la zona dañada.

Para seleccionar una parte de muestras grandes, se utilizará un bisturí, pinzas finas, alfiler entomológico, pincel, etc.

Las partes o muestras seleccionadas serán transferidas al medio de lavado.

### **Manipulación de las muestras:**

Toda muestra que va a procesarse para MEB, debe ser manipulada con cuidados extremos para no dañar su superficie, causar heridas, piquetes, deformaciones o romper partes de ella. Para ello se improvisan varios dispositivos que ayuden a tomar las muestras durante su selección, lavado, transferencia al contenedor microporoso y montaje. Entre los dispositivos están pinceles finos (000) de pelo natural, pipetas Pasteur, palillos, alfileres, pinzas de punta fina. Éstas últimas se usarán solo para especímenes grandes teniendo el cuidado de tomar con las pinzas en partes que no serán observadas.

## **LAVADO**

El tratamiento de las superficies de las muestras es lo más importante para Microscopía Electrónica de Barrido.

Materiales como mucosidades, secreciones, bacterias, suero, linfa, polvo, fibras, restos de tejidos o células y detritus, deben ser eliminados antes de la fijación, de otra manera el material se fija químicamente a la superficie del espécimen adhiriéndose de manera permanente, siendo imposible eliminarlo después. Éstos terminan impartiendo una apariencia sucia a la muestra y en muchos casos obstruyen detalles importantes durante la observación.

### **Recomendaciones generales**

Los tiempos de lavado suelen ser cortos 1 a 5 minutos y se puede agitar tan vigorosamente como la naturaleza de la muestra y el objetivo del estudio, lo permita.

Es necesario que la muestra esté siempre sumergida en líquido ya que en estos traspasos es posible que se adhieran a las orillas y expuestas al aire causando colapso de la superficie expuesta.

Todo este proceso se puede realizar en viales pequeños, pequeñas cajas de vidrio o pozos de portaobjetos.

### **Insectos, antenas, larvas, nematodos, organismos planctónicos:**

Utilizar agua destilada, SBF, o una solución de Tween o de detergente suave líquido (de una pequeña gota por 100 ml de agua destilada). Se puede utilizar un pincel fino u ondas ultrasónicas para desprender el material sólido adherido a la superficie de la muestra.

La solución a utilizar y la vigorosidad para el lavado, depende de la naturaleza química de la muestra, la fragilidad de la misma, el medio donde se obtuvo.

Durante el lavado se recomienda hacer varios cambios con solución nueva y observar bajo el estereoscopio la ausencia de partículas suspendidas.

Para hacer los cambios se puede utilizar pipetas Pasteur para retirar el líquido usado y vaciar el nuevo, siempre que la muestra sea observable a simple vista.

Si la muestra es muy pequeña o transparente, se debe utilizar el estereoscopio para extraer el líquido con la pipeta.

Otra manera de cambiar líquido, es coleccionar los especímenes utilizando pinceles de unos cuantos pelos, de un solo pelo, pipetas Pasteur, etc., para traspasarlos a un recipiente con líquido nuevo.

### **Organos internos disectados de plantas, insectos, animales, endoparasitoides:**

Se utiliza de preferencia una solución buffer de composición y pH afín al medio donde se encuentra.

Este tipo de muestras al disectarse liberan fluidos internos que son de naturaleza proteínica o polisacárida de apariencia transparente a menudo desapercibidas en un estereoscopio, pero cuando se secan dejan películas delgadas y opacas que cubren la superficie; este material debe llevar 5 a 10 cambios si es necesario.

### **Bacterias en medio líquido, esporas de hongos en cultivo líquido, organismos suspendidos en agua:**

Centrifugar a 5000 rpm por 3, 5 o 10 min (hacer ensayos hasta ver el botón compacto del centrifugado).

Usar solución buffer o agua destilada para resuspender.

Hacer un mínimo de tres cambios.

## **Cuidados y recursos para el lavado**

### **Estructuras delicadas:**

Para muestras de estructura filamentosa y delicada como micelios de hongos, glándulas u otro órgano interno, bacterias o organismos diminutos con apéndices, etc., los cambios deben hacerse cuidadosamente y sólo aplicar una agitación con vaivén suave.

Las muestras donde lo que se busca está adherido a su superficie como granos de polen o esporas sobre insectos u hojas, también deben tratarse muy suavemente durante el lavado.

### **Estructuras resistentes:**

Las larvas, insectos, antenas y otros animales diminutos con extrema cantidad de impureza, puede aprovecharse la turbulencia que provoca el adicionar el líquido de lavado con el chorro de una jeringa o pasar un pincel fino mientras se lava.

El uso del baño ultrasónico (60 Hz) ayuda a eliminar partículas sólidas adheridas a la superficie, pero algunas muestras suelen ser sensibles y se destruyen, se aconseja probar inmersiones de 2 ó 3 segundos y observarlas al estereoscopio; algunos insectos soportan inmersiones de hasta 30 segundos.

### **Otros casos:**

Hay muestras que no requieren de lavado ya que por naturaleza vienen limpias y se encuentran protegidas dentro de receptáculos ó cápsulas, tal es el caso de los granos de polen o semillas.

Otras muestras relativamente secas y resistentes como hojas, basta con limpiarlas con un pincel fino o hacer pasar aire comprimido sobre ellas, si las impurezas son partículas sólidas.

Bozzola y Russell (1992) y Hayat (1974), hacen algunas recomendaciones para la limpieza de superficies.

## **TRASPASO A CONTENEDOR POROSO**

La mayoría de las muestras que serán secadas a punto crítico es necesario mantenerlas adheridas sobre una superficie o confinadas en un contenedor para que no se mezclen con otras.

Para mayor comodidad y no dañar ni perder la muestra en pasos posteriores es aconsejable colocarla en una pequeña cápsula con perforaciones o poro de tamaño adecuado que no permita la salida de la muestra y sí el paso de líquidos al interior de la muestra. Para ello se utilizan varios tipos de recipientes, algunos comerciales, la mayoría ingeniosamente elaborados para este fin.

Existen contenedores comerciales que vienen con el equipo secador a punto crítico (SCP) o que se venden, pero su tamaño y particularidades de la forma pueden no ser los más adecuados para ciertas muestras, por lo que varios de estos recipientes son hechos en el laboratorio.

## Comerciales

### **Canastas de malla y Recipientes microporosos:**

Dedales o canastas de malla inoxidable (No. 50), vienen con el equipo de SPC. Su tamaño es de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>, son ideales para muestras relativamente grandes (0.5 a 0.8 cm de tamaño) tales como insectos, larvas, hojas, pedazos de tejidos, poliquetos.

Existen cápsulas de material microporoso (SPI supplies), están hechas de conglomerados de pelotitas de tal manera que el espacio entre ellas crea poros de 200 a 30 micras; el espacio interior es de 9 x 5 mm. Son muy prácticas e ideales para materiales delicados diminutos como glándulas de insectos, bloques de agar, insectos y larvas pequeñas. Un inconveniente es que algunos especímenes muy pequeños o con forma alargada pueden incrustarse en los espacios del conglomerado.

### **Microfiltro de policarbonato (Nucleopore) o celulosa (Millipore):**

Vienen de diferente tamaño de poro (20.0, 5.0, 0.5 y 0.2 micras); recomendados muestras que contienen microorganismos en concentraciones menores a un cultivo como agua de diferentes fuentes, suspensiones de partículas, cultivos líquidos. Se debe tener cuidado de utilizar un microfiltro y jeringa limpios.

## Manufacturados en el laboratorio

### **Tubos de policarbonato con perforaciones:**

Tubos pequeños de material plástico inerte como Eppendorf o cápsulas para incluir muestras en resinas para MET, se puede hacer perforaciones con una aguja caliente. Estos recipientes tienen la ventaja de tener la superficie lisa y mayor espacio interior.

### **Tubos Eppendorf con extremos de malla fina:**

Una alternativa es cortar el fondo de tubos de Eppendorf y sellarlos con una malla fina de 50 o 200 micras de diámetro de poro y hacer una perforación en la tapa interponiendo un trozo de la malla antes de taparlo.

Recomendado para muestras muy delicadas de tamaño pequeño (0.5 a 0.2 cm), como los gineceos de flores pequeñas, cortes finos de vegetales, biopelículas, insectos pequeños enteros, glándulas, nematodos, endoparasitoides y microcrustáceos.

### **Bolsitas de papel fino:**

El papel para limpiar lentes Ross Lens, tiene una estructura muy delgada y resistente, no se rompe ni suelta partículas ni fibras cuando se remoja en agua o alcohol. Se pueden elaborar bolsitas de 2 cm de largo por 1 cm de ancho usando un trozo de aproximadamente 4 x 5 cm y asegurando los extremos con cinchos de tiras de aluminio grueso.

Muestras diminutas que suelen trabajarse en grandes cantidades como algunos nematodos, ácaros, semillas, granos de polen y algunas esporas de hongos pueden ser bien retenidas en estas bolsitas.

### **Superficies preparadas con polilisina:**

Esto suele hacerse utilizando cubreobjetos de vidrio de 13 mm dia. con una capa de poli-L-lisina como material adhesivo; esta superficie deja un fondo muy homogéneo y se adhieren fácilmente material particulado suspendido como bacterias, virus. Estos materiales deben ser abundantes en la suspensión, de otra manera es mejor usar los microfiltros.

## **FIJACIÓN**

Algunas muestras pueden ser deshidratadas y secadas a punto crítico (SPC) sin previa fijación (ej. granos de polen y semillas con cutícula gruesa), la mayoría de muestras requieren de fijación. El objetivo de este paso es endurecer el contenido intracelular para que soporte el estrés físico de los pasos posteriores. En algunos casos, este proceso cesa la actividad enzimática matando al tejido o célula. Este objetivo puede lograrse por medios físicos (calor, congelación) o químicos (glutaraldehído, formaldehído, tetraóxido de osmio, por lo general).

Para fijar por calor puede utilizarse agua o buffer calentado a punto de ebullición y posterior calentamiento (1-5 min) a temperaturas ligeramente abajo del punto de ebullición. No es el método más recomendado, pero es útil en algunos casos cuando se quiere inmovilizar de inmediato al espécimen ya que los fijadores químicos son más lentos. Por ejemplo, este laboratorio ha utilizado este método para inmovilizar a *Phymasticus* mientras salía del cadáver de una broca y para provocar que ácaros de cultivos tropicales mueran con las patas extendidas.

La fijación química es el proceso más recomendado para MEB. El glutaraldehído (GA), formaldehído (FA) y tetraóxido de osmio (TO) son los fijadores más utilizados.

Dykstra (1992) detalla muy bien cuáles son los principios de acción, ventajas, desventajas y preparación de estos reactivos, esta información se encuentra resumida en el apartado de preparación de fijadores y soluciones buffer.

El Ga se utiliza sólo, disuelto en SBF o en fórmulas combinadas de GA y FA como la de Trump's o de Karnovsky.

El formaldehído sólo no es muy eficiente pero suele funcionar muy bien para la mayoría de insectos (Valdez, 1991) en una concentración al 2% cuando se disuelve en etanol al 70%.

El TO suele utilizarse en la mayoría de los casos como un segundo fijador, el Osmio suele reducirse al metal y quedar atrapado entre las moléculas de la muestra impartiendo mayor número atómico y por lo tanto reduce los efectos de carga de la muestra durante su observación. La toxicidad y alto costo de este compuesto son un inconveniente para su uso; por lo que se recomienda prescindir de éste siempre y cuando no se arriesgue la integridad y grado de fijación de la muestra. Los micelios aéreos

de los hongos son una excepción, ya que se recomienda exponerlos a vapores de TO unos minutos antes de sumergirlos en la solución fijadora de aldehídos. Los vapores hacen la delicada estructura del micelio más fuerte al estrés de sumergido en líquido.

Los procedimientos generales a seguir cuando se utiliza TO son la fijación secuencial utilizando primero GA al 2% (1-2 horas) en SBF 0.1M pH 7.2-7.4, seguida de una posfijación en TO al 1 ó 2% (1-2 horas) o mediante una fijación simultánea utilizando una solución mixta de GA al 2% y TO al 2% disueltos en SBF 0.1M, pH 7.2-7.4 preparados justo antes de su empleo.

El tiempo de reposo mínimo dentro del fijador depende del grosor de la muestra y de la porosidad de su superficie, como criterio general se puede aplicar que para muestras de 1 mm de grueso con una hora será suficiente, sin embargo algunas larvas son mas gruesas y con cutícula poco porosa que requieren hasta 24 horas o 3 días para lograr fijarlas. Bacterias, órganos internos, biopelículas pueden fijarse en tiempos tan cortos como 10 a 30 minutos. La experiencia de este laboratorio con varias muestras ha sido dejarlas desde 18 horas (es práctico colocar las muestras en el fijador como a media mañana y seguir las procesando en la mañana siguiente) y en algunos casos hasta más de una semana cuando se utiliza la solución de Trump's. En estos casos se recomienda refrigerar las muestras.

### **Recomendaciones para fijación:**

- Usar glutaraldehído al 2.5-ó 3.0% en SBF 0.1M pH7.2 para la mayoría de las muestras.
- Usar GA 0.5 - 1% para tejidos muy delicados y delgados, puede ser solo o con la formula de Trump's.
- Usar GA mayor a 3% (5% por lo general, o hasta 8%) para tejidos gruesos y con alto contenido de proteínas.
- Usar GA al 8% para nematodos.
- Usar Karnovsky modificado para larvas y tejidos vegetales vivos.
- Utilizar solución de Trump's, si la muestra es un tejido delicado o si no se va a procesar inmediatamente.
- Para biopelículas muestreadas con agua, usar GA 5% 1:1 para obtener una concentración final al 2.5%.
- Exponer a vapores de TO muestras de micelios aéreos de hongos.
- Muestras de colección fijadas con cualquier otra fórmula y conservadas en alcohol, no se vuelven a fijar, se prosigue la deshidratación con alcoholes.
- Granos de polen no se fijan, sin embargo algunos granos de polen fresco son muy suaves y suelen requerir fijación (esto se conoce sólo por prueba y error).
- Materiales secos de herbarios, sólo se sacuden y se cubren con metal.



## **SOLUCIONES BUFFER Y EL CONCEPTO DE OSMOLARIDAD**

Se utiliza soluciones buffer para tanto para lavar las muestras como para la preparación de fijadores con el propósito de mantener la tonicidad y osmolaridad de las células y evitar que éstas estallen o colapsen. Una solución isotónica tiene el mismo potencial osmótico del citoplasma dentro de la célula.

Sin embargo no es posible medir la osmolaridad del citoplasma de células vivas y utilizar una solución buffer adecuadamente isotónica para cada tipo de célula, por lo que suele utilizarse soluciones buffer cuya osmolaridad sea entre 200 y 300 mOsm, isotónico para la mayoría de las células (la sangre de mamíferos o fluido corporal, tiene una presión osmótica de 300 mOsm y pH 7.4).

La decisión de utilizar una solución de mayor o menor osmolaridad que la recomendada se toma de manera empírica considerando el tipo de célula que se trate y el medio que les rodea: por ejemplo las células animales al sólo tener membrana y en ocasiones cubierta mucosa, son más elásticas que las células vegetales que tienen pared, por lo tanto son más susceptibles a cambios en su forma; las células grandes son más susceptibles a distorsionarse que las pequeñas, células de tejidos altamente hidratados requieren osmolaridades bajas y organismos marinos alta osmolaridad.

Las soluciones buffer de más amplio uso en MEB, son las de fosfatos. Se preparan fórmulas según Sorensen o Millonig's y son preferidas por bajo costo y baja toxicidad.

El segundo buffer de elección es el de cacodilato de sodio, sobre todo para evitar la reactividad de los fosfatos cuando se utilizan otras reacciones bioquímicas sobre las muestras; tiene el inconveniente de alto costo y toxicidad. Para los propósitos de la MEB, no hay razón para su uso, salvo para organismos marinos cuyo exceso de sales pueden presentar reactividad con los fosfatos y precipitar cristales insolubles en la superficie de la muestra.

Los buffer de fosfatos funcionan muy bien a pH cercano al fisiológico o un poco mayor, de ahí que la mayoría de los autores recomienden rangos de pH de 7.2 a 7.4 (200 a 300 mOsm), arriba o debajo de este rango la capacidad amortiguadora decae drásticamente.

Más adelante, en el apartado de preparación de soluciones se encuentran datos de osmolaridad de la mayoría de ellos y para elevar la osmolaridad de buffers y fijadores se utiliza sacarosa, glucosa o sal y para disminuirla, una dilución con agua destilada.

## **DESHIDRATACIÓN**

La deshidratación tiene como objetivo eliminar el agua de la muestra sustituyéndola por etanol el cual puede ser posteriormente intercambiado por el CO<sub>2</sub> líquido durante el secado a punto crítico (SPC).

El agua es poco miscible con el CO<sub>2</sub> u otros líquidos alternativos para el secado, por ello se utiliza el etanol como líquido de transición.

Este proceso se hace de manera gradual evitando así encogimiento drástico de las células, para ello se preparan diluciones con agua destilada de etanol al 10%, 20%, 30%, etc., siempre al llegar al etanol 100% se hace un segundo cambio y se deja mayor tiempo para asegurar la completa remoción del agua.

Los tiempos suelen ser cortos, menores que el de fijación (recordar que la molécula de etanol es más pequeña que la de GA y el tejido fijado es también más permeable que el natural). Dependiendo del grosor de la muestra, 5 a 45 minutos son suficientes para la mayoría de las muestras, aunque algunas larvas son bastantes impermeables al paso de líquidos y pueden requerir hasta 24 horas de reposo en cada solución.

Se debe evitar exponer al aire la muestra durante los cambios por lo que se puede dejar un residuo del líquido a eliminar durante cada cambio para que rodee la muestra y hacer la sustitución en seguida.

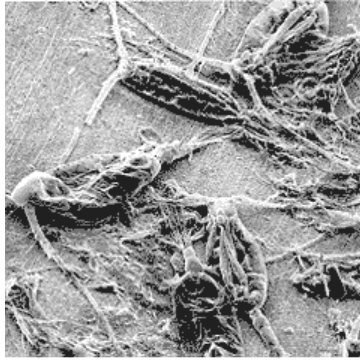
## **SECADO**

Las muestras que son secadas al aire pueden exponerse a tensiones superficiales tan altas como 2000 psi y resultar en un encogimiento del tejido tan elevado como 45% o más.

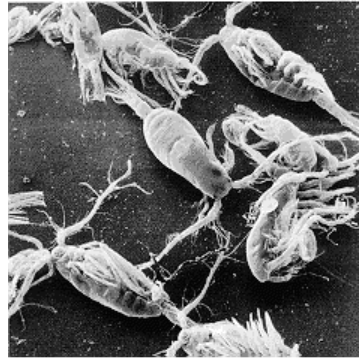
El secado al punto crítico (SPC) es el método más confiable y con menos artefactos, recomendado para muestras muy blandas y altamente hidratadas. Este se basa en el principio que a ciertas condiciones de temperatura y presión, un fluido iguala su la densidad de su fase líquida con la de vapor haciéndose indistinguible la interfase (punto crítico). En estas condiciones es posible llevar un todo el líquido a la fase vapor sin que exista tensión en la superficie de la muestra.

Se utiliza CO<sub>2</sub> ya que es el líquido cuyo punto crítico (31°C, 1072 psi) puede lograrse con relativa facilidad en condiciones de laboratorio, en comparación con el punto crítico del H<sub>2</sub>O (374°C, 3212 psi).

Primeramente la muestra, dentro de un contenedor poroso y en etanol al 100%, es colocada en una cámara de acero inoxidable resistente a altas presiones; luego se llena con líquido de CO<sub>2</sub> a temperatura 15 a 20 °C y se abre la válvula de drenaje para dejar salir el exceso de etanol, se hacen varios cambios hasta asegurar la eliminación completa del etanol antes de elevar la temperatura de la cámara hasta el punto crítico del CO<sub>2</sub>. Se mantiene un tiempo a temperatura un poco mayor (36-38°C, 1200 psi) para asegurar la evaporación completa y se procede a abrir la válvula de liberación para eliminar el vapor de manera lenta (aprox. 100 psi/min de disminución de presión).



(a) Air drying



(b) Critical point drying

En las copias proporcionadas de los diferentes autores se encuentra una amplia información sobre este método.

Este método no siempre es el más adecuado para todas las muestras, algunas de estructura muy frágil y hueca, suelen colapsarse aún con éste método.

Existen otras alternativas para el secado de las muestras como el uso de Hexametildisilano (HMDS) y Peldri II que en algunas muestras ha dado resultados comparables con el SPC.

El HMDS es un líquido con baja presión de vapor que al evaporarse no provoca gran tensión en la superficie de la muestra. Al ser miscible con etanol y lo puede sustituir fácilmente, luego dejarse evaporar libremente dentro de campana de extracción de gases. Dykstra (1993) detalla el procedimiento para este tipo de secado.

Existen varios reportes de autores que han utilizado este método exitosamente en larvas, bacterias, moscas y varias otras muestras.

El uso del HMDS tiene la ventaja de ser un líquido relativamente barato y se puede prescindir del equipo necesario para llevar a cabo el SPC.

En este laboratorio se ensaya el secado con HMDS como una alternativa de bajo costo. Ha ayudado a poder trabajar muestras únicas (el SPC es más barato si se llena la cámara a su máxima capacidad (10-15 muestras), en otros casos cuando no se cuenta con reserva de CO, y en el caso de muestras demasiado frágiles como algunas glándulas de insectos. Entre las muestras que se han secado exitosamente con este método están bacterias, biopelículas, larvas de caracol, copépodos, larvas y huevos de phymasticus, insectos adultos.

Las muestras secadas por cualquiera de los métodos son sumamente frágiles e higroscópicas, deben conservarse en un recipiente cerrado con sílica gel para evitar que retomen humedad.

## **MONTAJE**

Para realizar esta operación se recomienda trabajar con guantes, pinzas o con las manos perfectamente lavadas y secas para evitar introducir grasa al sistema del MEB.

### **Los portaobjetos:**

Después que las muestras han sido secadas se procede a montarlas en bases metálicas para microscopios electrónicos, estas son por lo general de aluminio, cobre o latón; sus dimensiones y forma específica depende de la marca del MEB. Éstos deben estar perfectamente limpios y libres de grasa, si ya ha sido utilizado, se tallan con pasta pulidora de metal Wenol y finalmente con acetona.

### **Las muestras:**

Las muestras secas son muy frágiles y deben manipularse con un pincel muy fino de pelo de camello, alfileres entomológicos, pinzas de punta fina, palillo con punta fina, incluso una pestaña pegada a un palillo puede funcionar perfectamente. Se destapa cuidadosamente el contenedor poroso en una tapa de caja Petri de vidrio y se inspecciona la muestra bajo el estereoscopio, si hay varios especímenes se pueden escoger los menos dañados o que ofrezcan la vista que se desea explorar. Durante esta exploración se puede ensayar las posibles posiciones que se desean observar antes de proceder a adherir la muestra a la superficie del portaobjetos.

### **Los adhesivos:**

Para adherir (montar) la muestra a la superficie del portaobjetos metálico hay varias opciones de pegamentos:

- Discos adhesivos de carbón conductivo, éstos tienen un acabado perfecto, no se deforman con el calor y forman un fondo uniforme en la fotografía, se recomiendan para muestras diminutas y partículas sueltas, donde por lo general puede salir el fondo en la fotografía.
- Cinta de celofán y otro material con doble pegamento, se utiliza para adherir muestras que han sido fijadas a cubreobjetos de vidrio, filtros microporosos, etc. También se utiliza para acomodar bien muestras relativamente grandes y de estructura caprichosa y posteriormente rellenar la base con pintura de plata.
- Pintura y pasta de plata y pintura de carbón conductivo, se recomiendan para tamaños de muestras relativamente grandes y de forma caprichosa. La consistencia de la pintura se ajusta para que no sea tan diluida que se suba por las paredes de la muestra, ni tan espesa que seque rápidamente antes de pegar la muestra. Se procede a aplicar una gota gruesa de la pintura y acomodar la muestra para que quede prácticamente con la base enterrada en la gota.

Las muestras montadas no deben presentar espacios entre el portaobjetos y la superficie de la muestra, ya que en esos huecos puede retenerse electrones que impidan la emisión de señal de parte de la muestra y por consecuencia dificultan su observación. Para ello se suele rellenar con pintura de plata o carbón todos estos espacios utilizando un pincel muy fino.

Las orillas de cintas no conductivas, cubreobjetos de vidrio y filtros deben sellarse con pintura también, para "hacer tierra" con el portaobjetos metálico.

Aunque el MEB ofrece la posibilidad de inclinar y rotar la muestra para explorarla de diferentes ángulos, se recomienda siempre que sea posible, orientar hacia arriba la parte de la muestra que se desea observar, por ej. una en postura dorsal, otra en lateral y otra en ventral, de esa manera se facilita la observación al MEB.

### **CUBRIMIENTO CON METAL**

Para hacer conductiva a una muestra se aplica una capa muy delgada de metal de alto número atómico. El método más utilizado es el de "sputter coating", el equipo forma una nube de iones argón y átomos de metal descargados de una laminilla, que caen suavemente sobre la muestra cubriéndola uniformemente en toda su topografía. Este es un proceso relativamente rápido y se realiza en un equipo especial denominado Sputter Coater

El metal de la laminilla preferentemente es oro o una aleación de oro-paladio, se escogen estos dos metales por tener la característica de formar partículas muy finas inadvertidas en los MET o MEB, además del alto número atómico de estos metales le imparte mayor conductividad a la muestra emitiendo una señal más fuerte para formar su imagen. El grosor de la capa que llega a formarse sobre la muestra es de aproximadamente 20 nm.



### **OBSERVACIÓN**

La muestra ya cubierta con metal es introducida al MEB para su observación.

Durante la observación se deben tener en cuenta varios factores para lograr una imagen aceptable a la magnificación deseada; éstos son la distancia de trabajo (DT), el tamaño de la apertura de los lentes electrónicas finales (lentes objetivo), el tamaño del diámetro del haz de electrones (SS, spot size) y el voltaje de aceleración (kV).

- Respecto a la distancia de trabajo, se recomienda lo más corta posible, pues a medida que aumenta esta medida, se aleja la muestra del detector y la señal para la imagen es más pobre. Para ello es recomendable no tratar de fotografiar especímenes completos de un tamaño mayor a 2 o 3 mm, para que la DT no pase de 10 mm, muestras de mayor tamaño requieren mayores DT para que salgan completas en un campo de observación. También suele aumentarse un poco la DT para obtener una mayor profundidad de foco.
- Las lentes objetivos cuentan con una tira de aperturas variables; 30, 50, 100 y 200 micras, éstas delimitan la cantidad final de electrones que llegan a la muestra y afectan a la profundidad de foco. Se recomienda utilizar las dos más pequeñas con altos kV (5-20) para exploraciones a grandes aumentos que requieran mayor resolución o para obtener una mayor profundidad de foco. Lo más recomendable es comenzar con la apertura de 100 micras y explorar kV's menores a 5, si la resolución o señal no es aceptable, se cambiará a 50 micras, son estos dos últimos valores los que más se emplean en la mayoría de las observaciones.
- El diámetro del haz de electrones, SS, se manipula bajo el razonamiento de imaginar la punta de un lápiz; para definir mejor los bordes de los componentes o ultraestructura de la muestra, se procede a disminuir el SS y viceversa, aunque también depende del kV, ya que si este es bajo, requerirá un mayor diámetro para que pasen suficiente electrones que formen la señal para la imagen. También se recomienda comenzar a explorar con un valor medio de SS dentro de la escala, en el caso del MEB Topcon SM 510, éste será un valor de 5 ó 6.
- Por último el voltaje de aceleración, kV, determina el diferencial de voltaje aplicado al filamento para acelerar los electrones primarios a su salida, afectando también el impacto que tengan sobre la muestra y la posibilidad de emisión de electrones secundarios desde la muestra. Para la mayoría de las muestras biológicas se recomienda utilizar de 10-15 kV, asumiendo que a este valor los electrones primarios impactan hasta una profundidad de 5-10 nm y desprende electrones secundarios de los átomos de la muestra, con la que se forma la señal para la imagen en el CRT. Valores mayores de kV hacen que los electrones impacten a mayores profundidades y disminuye la probabilidad de emisión de electrones secundarios; bajos voltajes producen una mayor cantidad de señal secundaria. Se recomienda comenzar a hacer exploraciones a bajos voltajes y elevar su valor para aumentar la resolución de la imagen, si es necesario.

Finalmente, muestras con topografías muy complicadas pueden presentar partes no cubiertas con metal y retener electrones a altos kV, sobre todo si se inclina la placa del portamuestras corre la posibilidad de explorar partes no cubiertas enviando poca señal y observándose las partes oscuras y a veces incurrir en quemaduras de la muestra.

## REFERENCIAS CONSULTADAS

Alternatives to critical point drying of specimens. Sphecos 30 Jun1996.  
[http://www.sel.barc.usda.gov/selhome/sphecos/sph30\\_26.htm](http://www.sel.barc.usda.gov/selhome/sphecos/sph30_26.htm). Consulta marzo 2003.

Bozzola, John J. and Lonnie D. Russell. 1991. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Jones and Barlett publishers. USA.

Dykstra, Michael J. 1992. Biological electron microscopy: theory, techniques and troubleshooting. Plenum press. New York.

Dykstra, Michael, J. 1993. A manual of applied techniques for biological electron microscopy. Plenum press. New York.

Hayat, M.A. 1974. Principles and techniques of scanning electron microscopy, biological applications. Vol. 1. Van Nostrand Reinhold Co. New York.

Kalab, M. 2003. Microstructure of bacterial filters used as support in scanning electron microscopy. <http://www.magma.ca/~^scimat/>. Consulta marzo 2003.

Martin N.A. 1991. Scanning electron micrographs and notes on broad mite *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), (Acari:heterostigmata:tarsonemidae). New Zealand Journal of Zoology 18:353-356.

Pollen Removal Techniques. [http://pollen.usda.gov/research\\_techniques/SEM\\_preparation\\_techniques.html](http://pollen.usda.gov/research_techniques/SEM_preparation_techniques.html). Consulta, octubre 2003.

Preparation of ciliated protozoa for scanning electron microscopy. <http://www.ku.edu/~bcmic/MEIL/techniques/>. Consulta, octubre 2003.

Robertson Robert. 1971. Scanning electron Microscopy of planktonic larval marine gastropod shells. The Veliger 14(1):1-12

Rumph, John A. and William J. Turner. 1998. Alternative to critical point drying for soft bodied insect larvae. Entomological Society of America 91 (5): 693-699.

The Microscopy ListServer -- Sponsor: The Microscopy Society of America. To Subscribe/Unsubscribe <http://www.msa.microscopy.com/MicroscopyListserver> . On-Line Help <http://www.msa.microscopy.com/MicroscopyListserver/FAQ.html>

Valdez, Jorge. 1991. Preparación de insectos y ácaros para microscopía electrónica de barrido. Bol. Soc. Mex. Entomol. (8):9-18.

Watt, Ian, M. 1997. The principles and practice of electron microscopy. Second edition. Cambridge University press. Great Britain.

### ABREVIACIONES

DT distancia de trabajo

FA formaldehido

MEB microscopio (microscopía) electrónico (a) de barrido



GA	glutaraldehido	MET	microscopio electrónico de transmisión
HMDS	hexametildisilano	SBF	solución buffer de fosfatos
kV	kilo Voltios, medida de voltaje de aceleración	SPC	secado a punto crítico
LMEB	laboratorio de microscopía electrónica de barrido, de Ecosur	SS	spot size, tamaño del diámetro de haz de electrones
		TO	tetraóxido de osmio

### **EQUIVALENCIAS DE MEDIDAS**

1 milímetro (mm) = 1000 micras ( $\mu\text{m}$ )

1 micra ( $\mu\text{m}$ ) = 1000 nanómetros (nm)

1 nanómetro (nm) = 10 Amstrong (A)

1 Amstrong (A) =  $10^{-4}$  micras

## PREPARACION DE SOLUCIONES

### BUFFER DE FOSFATOS A VARIOS pH, SEGÚN SORENSON´S.

#### A) Preparación de soluciones stock:

Solución A : (0.2M) fosfato de sodio monobásico,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (PM, 120).

Solución B: (0.2M) fosfato de sodio dibásico,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (PM, 268).

Pesar las siguientes cantidades:

Sol. "A" (g $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Sol. "B" (g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Aforo (ml)
0.12		5
0.24	0.536	10
0.6	1.341	25
1.2	2.68	50
2.4	5.365	100

NOTA: Si dispone de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (PM, 138), puede preparar la solución A pesando 2.76g y para la solución B, se pesará 2.84 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro (PM, 142); aforando a 100 ml ambas soluciones se obtiene una concentración 0.2M y puede utilizar la siguiente tabla para obtener una solución 0.1M al pH deseado.

#### B) buffer a diferentes pH´s (0.1M)

pH	Sol. "A" (ml)	Sol. "B" (ml)	Aforo (ml) (ml)
5.8	4.0	46.0	200
	1.0	11.5	50
6.0	6.15	43.85	200
	1.54	10.96	50
6.2	9.24	40.75	200
	2.31	10.18	50
6.4	13.25	36.75	200
	3.31	9.94	50
6.8	24.5	25.5	200
	6.12	6.38	50
7.0	30.50	19.50	200
	7.62	4.87	50
7.2*	36.0	14.0	200
	9.0	3.5	50
7.4	40.5	9.5	200
	10.2	2.2	50
8.0	47.35	2.65	200
	11.84	0.66	50

- osmoralidad a pH 7.2, 0.1M: 226 mOsm
- La solución se filtra con papel Whatman No 5 ó 6 y se mantiene en refrigerador hasta por 3 meses, observar siempre la transparencia de la solución antes de usar, si no filtrar de nuevo.

**BUFFER DE CACODILATO DE SODIO 0.1M**

**Solución A:** (0.2M) cacodilato de sodio,  $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$  (PM, 160)

1. Pese en un vaso de precipitado pequeño las siguientes cantidades según el volumen a preparar:

$\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (g)	$\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$ (g)	Aforo (ml)
42.8	32	100
10.7	8.0	25
4.28	3.2	10

- Adicione la mitad de aforo de agua destilada para disolver. Use guantes y evite el contacto con el reactivo que es tóxico.
- Vierta el cacodilato disuelto al matraz aforado.
- Enjuague el vaso con más agua destilada y viértala al matraz aforado.
- Afore el matraz a la marca.
- Traspase la solución a un frasco de plástico con tapadera de rosca.
- Etiquete el frasco (contenido, fecha)
- Guarde el frasco a temperatura ambiente.

**Solución B:** (0.2M) ácido clorhídrico concentrado, 36-38%, HCl (PM, 36)

- Tome una pipeta graduada de 1.0 ml con una perilla al extremo.
- Mida 0.1 ml de ácido clorhídrico.
- Viértalos dentro de un frasco de 10 ml con tapadera de rosca.
- Adicione al frasco 6 ml de agua destilada.
- Etiquete el frasco (contenido, fecha).
- Guarde el frasco a temperatura ambiente.
- Para ajustar la cantidad de la siguiente tabla prepare múltiplos de esta fórmula (2 ml ácido + 12 ml agua).

**Preparación de buffer a diferentes pH's (0.1M)**

(ml indicados de la solución "B" para obtener el pH deseado)

A 25 ml. de la solución "A", adicione		A 10 ml. de la solución "A", adicione	
pH	Solución "B" (ml)	pH	Solución "B" (ml)
6.4	18.3	6.4	7.3
6.6	13.3	6.6	5.3
6.8	9.3	6.8	3.7
7.0	6.3	7.0	2.5
7.2	4.2	7.2	1.7
7.4	2.7	7.4	1.1

Afore a 50 ml. Con agua destilada      Afore a 20 ml. Con agua destilada

- Etiquete el frasco (contenido, fecha).
- Guarde el frasco en refrigeración.

**SOLUCION DE MILLONIG'S (1964)**

	Para tejidos muy hidratados*		Para organismos marinos** (hipertónica)	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g)	2.325	0.58	2.324	0.58
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (g)	0.156	0.04	0.156	0.04
*NaCl (g)	0.5	0.125	3.0	0.75
Aforo (ml)	100	25	100	25

\*Solución a pH 7.4, 440 mOsmol, hipertónico para la mayoría de las células

**SOLUCION DE FORMALDEHIDO DILUIDA EN SOLUCIÓN DE ETANOL AL 70%**

Usar solución de formaldehído al 37%, grado microscopía electrónica

Concen- tración	formaldehído 37% (ml)	aforo con Et- OH 70% (ml)
2 %	0.54	10
	1.35	25
	2.7	50

La solución se filtra con papel Whatman No 5 o 6 y se mantiene estable a 4 °C hasta por un año.

**SOLUCION DE TRUMP´S\*, CON 4% DE FORMALDEHIDO Y 1% DE GLUTARALDEHIDO (4F:1G).** (ver Dykstra, 1992, p.21)

Vol. aforo (ml)	GA 25% (ml)	FA 37% (ml)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	NaOH (g)
100	4.0	10.0	1.0	0.27
50	2.0	5.0	0.50	0.135
25	1.0	2.5	0.25	0.0675

\* Solución 176 mOsm

La solución se filtra con papel Whatman No 5 o 6 y se mantiene estable a 4 °C hasta por tres meses

**SOLUCION DE KARNOVSKY MODIFICADA, CON 2% DE FORMALDEHIDO Y 2.5% DE GLUTARALDEHIDO (2F:2.5G)**

GA 25% (ml)	FA 37% (ml)	Aforo con SBF* (ml)
10.0	5.0	100
5.0	2.5	50
2.5	1.25	25
1.25	0.75	10

\* pH 7.0-7.4, 0.1M

## CARACTERÍSTICAS DE LOS FIJADORES Y RECOMENDACIONES PARA SU USO

### **SOLUCIÓN DE GLUTARALDEHIDO EN SBF 0.1M**

- Actúa principalmente sobre proteínas formando enlaces entrecruzados entre grupos amino, también puede actuar de la misma manera sobre los grupos amino de los fosfolípidos.
- Causa ligero encogimiento de los tejidos, se recomienda diluir en soluciones hipertónicas.
- Penetración lenta en los tejidos (0.7 mm después de 3 h).
- Preferentemente no trabajar muestras mayores a 1 mm de grosor, ya que el glutaraldehído penetra más lentamente a partes internas debido a la fijación de las capas externas.
- Usar a temperatura ambiente o refrigeración.
- Se recomienda no dejar la muestra más de 3 h en este fijador.
- Se utiliza para la mayoría de los tejidos altamente húmedos.
- Si la muestra es grande o acuosa, se recomienda usar concentraciones mayores a 3%.

### **SOLUCION DE KARNOVSKY, 1965 (4F:5G)**

- Aplicaciones y ventajas similares a la de Trump's.
- Solución original con  $\text{CaCl}_2$  (0.5M), 4% formaldehído y 5% glutaraldehido es altamente hipertónica, 2010 mOsm, altamente hipertónica para la mayoría de las células.
- Solución a la mitad de fuerza que la original, es utilizada actualmente por la mayoría de los investigadores.
- Usar la solución original como alternativa para tejidos difíciles de fijar o cuando se recomienda exclusivamente esta solución.

### **SOLUCIÓN DE FORMALDEHIDO AL 2% DILUIDA EN ETANOL AL 70%**

- Recomendada por Jorge Valdez para artrópodos pequeños.
- Para artrópodos enteros, dejar en esta soln. 24 h mínimo, luego se pueden conservar en etanol al 70%.

### **SOLUCIÓN DE TRUMP'S, 1976 (4F:1G)**

- Misma acción que el glutaraldehido pero reforzada por la rápida penetración del formaldehido.
- Usar a temperatura ambiente o refrigeración.
- Ideal para muestras que requieren almacenarse.
- La muestra puede permanecer en este fijador varios meses en refrigeración.
- Recomendable hacer una posfijación de 1 h en solución 1% de osmio.

### **SOLUCION DE TETRAOXIDO DE OSMIO 1%**

- Reacciona principalmente sobre lípidos oxidando los dobles enlaces.
- La forma reducida del metal permanece en el tejido impartiendo mayor número atómico y contrarrestando efecto de carga durante la observación.
- Causa alguna desnaturalización de las proteínas pero puede extraer pequeños péptidos durante los lavados y deshidratación posterior.
- Trabaja como fijador secundario.
- Los vapores o solución tienen la facilidad de penetrar en el tejido cesando el movimiento citoplasmático en cuestión de minutos o segundos, mata tejido rápidamente deteniendo las reacciones de deterioro.
- Presenta velocidad de penetración muy lenta, 0.5 mm en una hora.
- Se recomienda dejar 1-2 h para muestras de 1 mm de grosor.

**Regresar al inicio:**

**Para volver a la página hacer "click" en:**

**"Material didáctico" del menú principal a la izquierda**