

EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LOS POLÍMEROS Y OTROS MATERIALES.

III. ULTRAMICROTOMIA

Gilma Hernández, José Luis Prin y Blanca Rojas de Gáscue

Universidad de Oriente, Instituto de Investigación en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCAUDO). Cerro del Medio, Av. Universidad, Cumaná, Estado Sucre. Venezuela. Red Cytel, Nodo UDO de la Red Temática 208RT0340-“REDE IBEROAMERICANA DE BIOFABRICAÇÃO: MATERIAIS, PROCESSOS E SIMULAÇÃO. Correo electrónico: blanca_gascue@yahoo.com

Recibido: 10 de junio de 2009; Aceptado: Diciembre de 2009

RESUMEN

El presente trabajo forma parte de una serie que abarca la descripción operativa y técnica de la microscopía electrónica y la ultramicrotomía, tanto desde el punto de vista operacional de quienes manipulan rutinariamente estos equipos, como desde su aplicación como herramientas para la evaluación de la morfología en los materiales polímeros.

Debido a la descripción detallada que se reporta en cada una de las técnicas, se hizo necesario dividir este trabajo en tres partes, que abarcan la microscopía electrónica de barrido (MEB), la microscopía electrónica de transmisión (MET) y la ultramicrotomía, todos ellos acompañados de algunos ejemplos de aplicación en diversos materiales poliméricos. Específicamente este módulo se centra en la ultramicrotomía y su aplicación en polímeros.

Palabras claves: Ultramicrotomía, Morfología.

ABSTRACT

The present work embraces the operative description of the Electronic Microscopy and the Ultramicrotome, so much from the operational point of view of those who manipulate these teams routinely, like from its application like tools for the evaluation of the morphology in the material polymers.

Due to the detailed description that is reported in each one of the techniques, it became necessary to divide this work in three parts that embrace the scanning electronic microscopy (SEM), the transmission electronic microscopy (TEM), the ultramicrotome, and some application in diverse material polymers. Specifically this module is centered in ultramicrotomy and its application in polymers.

Key words: Ultramicrotome, Morphology

1. INTRODUCCION

En el interior del portamuestras del microscopio electrónico de transmisión (MET) la muestra tiene que ser transparente a los electrones, por lo que debe tener un espesor máximo que dependerá del tipo de interacción electrón-muestra utilizado para formar la imagen y del modo de operación.

En muchos casos la muestra a ser estudiada no es lo suficientemente delgada para poder ser observada al microscopio, y es necesario cortarla en secciones finas. Los cortes para microscopía óptica se llevan a cabo con aparatos denominados micrótomos, que realizan cortes de un grosor controlado mediante cuchillas de metal. Si el material ha sido congelado, se le secciona en un micrótomo especial denominado crioultramicrotomo, en el cual la muestra y la cuchilla se

mantienen a baja temperatura.

Para las muestras a ser analizadas en el microscopía electrónico se utilizan equipos especiales llamados ultra-micrótomos, equipados con cuchillas de vidrio o diamante, capaces de obtener cortes ultrafinos de unos pocos nanómetros de espesor. Estos cortes se colocan sobre pequeñas rejillas de cobre que sirven para llevarlos al MET.

Para poder llevar a cabo las operaciones de corte de la muestra, es ideal poder manipularla en el ultramicrotomo en la forma de un “taco”. En los materiales polímeros esto puede ser relativamente sencillo de obtener a partir del moldeo por compresión del material a las condiciones adecuadas de presión, tiempo y temperatura.

Pero hay ocasiones en que el material puede ser blando o por el contrario muy frágil, para poder realizar los cortes por lo que se hace necesario endurecerlo previamente, ya sea por congelación o por inclusión en un material adecuado. La gelatina, la parafina y otras sustancias sintéticas similares son los materiales comúnmente utilizados en las muestras biológicas para este fin. Los materiales por su parte, cuando van a ser caracterizados por microscopía electrónica de transmisión, se incluyen en resinas plásticas tipo "epoxi" que endurecen al polimerizar. Así se obtiene un bloque o taco que contiene en su interior al material en estudio, y que tiene la consistencia apropiada como para poder realizar cortes finos.

Una vez que los cortes son colocados en las rejillas de cobre, no necesitan que la resina plástica sea eliminada, sino que directamente se colocan en soluciones que contienen sales de metales pesados (por ejemplo de acetato de uranilo y citrato de plomo), para proporcionar contrastación a las diferentes estructuras y quedar listos para su observación. Este método también se hace necesario aplicarlo en algunos materiales que son tan duros que se fragmentan al impacto con la cuchilla de corte.

Al igual que en los dos módulos anteriores de esta serie, sobre MEB y de MET, a continuación se detallan los aspectos operativos de la ultramicrotomía, a considerar al caracterizar una muestra polimérica, desde el punto de vista de quien manipula el equipo rutinariamente, y conoce las variables necesarias para generar óptimos cortes de los materiales poliméricos, en especial de los polietilenos.

1. ULTRAMICRÓTOMOS

Todos los ultramicrotomos varían en complejidad, desde los más simples de operación manual, derivados de los micrótomos para uso con bloques de parafinas, a los automáticos operados con motor. Los movimientos son permitidos por medio de bandas flexibles, pivotes de punto o pelota.

Los ultramicrotómicos más modernos además de facilitar alto poder de corte y velocidad muy constante cuenta con las siguientes propiedades:

1. Sistema de avance lineal térmico o mecánico, ambos muestran construcción similar.
2. Es posible cortar en forma automática o manual, con una velocidad de corte mínima en el modo automático de aproximadamente 0,1 mm/s.
3. Se puede cambiar fácilmente del modo de corte fino al semifino y a la inversa.
4. Buen sistema óptico y de iluminación para dar seguimiento al proceso de corte y para simplificar el alineamiento del espécimen respecto a la cuchilla.
5. Unidades integradas para el amortiguamiento de la vibración.
6. Un diseño ergonómico.

En la Figura 1 se pueden describir los pasos y movimientos necesarios para llevar a cabo los cortes: El bloque con la muestra (a), es tallado en forma de pirámide truncada, asegurándose fijarlo a la base porta bloque (b), que esta sujeta al final del brazo (c), el cual es muy rígido y al que se le permiten tres movimientos: el movimiento (1) se denomina de corte, lleva la cara del bloque hacia abajo para que haga contacto con el filo de la cuchilla (d), previo a su montaje en la base porta cuchilla (e), y permitiendo la realización del corte. El movimiento (2) mueve el bloque hacia atrás antes de volver al punto inicial, evitando así que la cara del bloque se golpee contra la base porta cuchilla. El movimiento (3), es el de avance lineal, mueve el bloque hacia delante con incrementos según el grosor seleccionado.

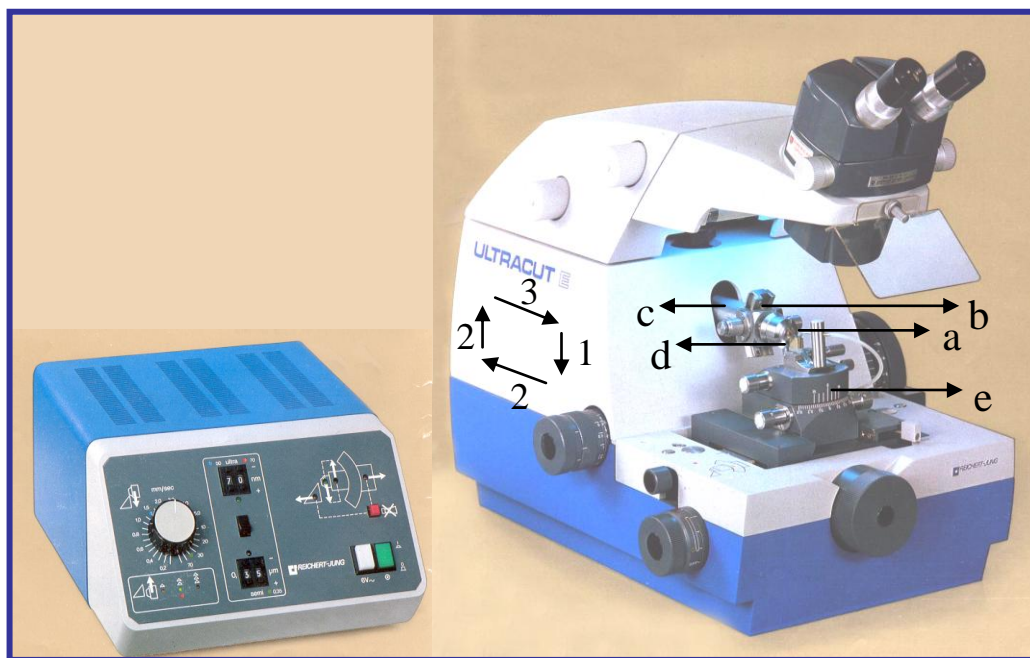


Figura 1. Ultramicrotomo donde se distinguen: (a) bloque con la muestra, (b) la base porta bloque, (c) el brazo, (d) la cuchilla y (e) la base porta cuchilla (Hernández, 2004).

La cuchilla (d) se asegura firmemente a la base porta cuchilla (e), la cual puede moverse tanto horizontal como verticalmente para permitir la selección de la mejor parte del filo y que el filo de la cuchilla y la cara del bloque se encuentren paralelos.

2. Grosor de los cortes. En su gran mayoría los materiales y minerales son demasiado gruesos para ser vistos al MET, por lo que deben ser cortados muy finos, para que el haz de electrones pueda traspasarlo. Al cortar una muestra debe recordarse que para obtener el máximo de contraste y resolución los cortes deben ser delgados para eliminar la superposición estructural, poder ser vistos con los electrones transmitidos y ser resuelto por el sistema óptico del MET. El contraste se aumenta cubriendo con metales pesados, usando bajos voltajes y utilizando pequeñas aberturas en el lente objetivo.

El grosor óptimo de un corte esta determinado por el objetivo de la investigación. No siempre los mejores cortes son los más delgados (ultrafinos 50 nm), en algunos casos los cortes más gruesos (finos 60-90 nm) son mejores considerando el contraste y la distribución de la microestructura dentro de la muestra. Además, es más fácil obtener y manipular cortes finos que los ultrafinos.

Para una correcta interpretación de una micrografía electrónica es necesario conocer el grosor de los cortes, éste se estima al observar el color de interferencia de la luz reflejada por el mismo mientras flota en el agua (ver Figura 2) (Reid y Beesley, 1991). El color de interferencia sirve como patrón aproximado de su grosor, se recomienda trabajar con cortes entre 60-90 nm (plateados a dorados).

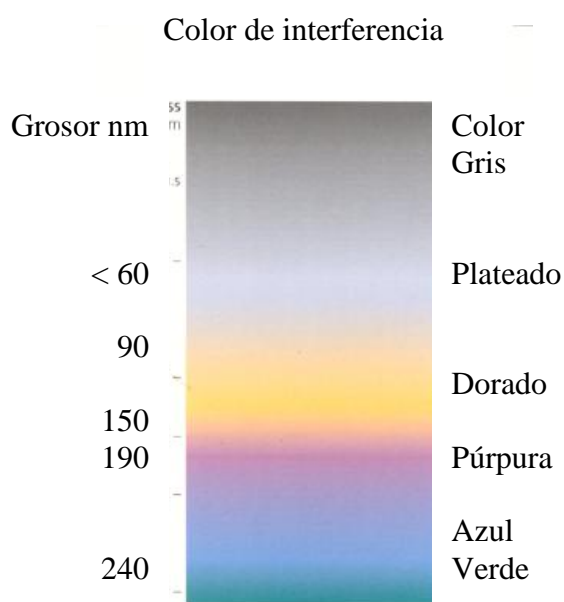


Figura 2. Tabla de referencia de colores para los cortes, obtenida a partir de la interferencia de la luz reflejada por los cortes finos.

3. Velocidad de corte. Para obtener cortes finos de buena calidad hay que tomar en cuenta la velocidad de corte, por lo general se realizan con velocidad relativamente baja. Entre dos cortes consecutivos, el tiempo debe ser suficiente para que la distorsión que se produce pueda relajarse. Con velocidades muy altas, se producen variaciones en el grosor de los cortes, arrugas y vibraciones, ya que los plásticos tienden a fracturarse al ser cortados por el filo de la cuchilla, y a su vez crear deformación permanente de la microestructura. Por otro lado, una velocidad de corte muy baja también crea problemas de variación en el grosor de los cortes.

La velocidad de corte óptima depende del ultramicrotomo, tipo y dureza del plástico, la muestra, el tipo y calidad de la cuchilla. Sin embargo, se considera que los plásticos pueden cortarse a velocidades relativamente altas (alrededor de 5 mm/s), mientras que las resinas epóxi y los poliésteres se realizan con velocidades medias (entre 1 y 2 mm/s) (Moreira, 1994).

Los ultramicrotomos automáticos permiten mantener el ritmo y la velocidad de corte deseada, ya que para mantener una velocidad constante cuando se opera un ultramicrotomo manual se requiere de bastante experiencia.

4. Cuchillas. Cuando los primeros ultramicrotomos fueron desarrollados a partir de los microtomos convencionales empleados para microscopía óptica se cortaba inicialmente con cuchillas de metal. El grosor del corte resultante ($> 1 \mu\text{m}$) y su calidad en términos de preservación de la estructura y topografía de la superficie no eran los más óptimos para microscopía electrónica. Luego, se emplearon filosas cuchillas de afeitado mejorando en forma notable la calidad de los cortes. Como alternativa a las cuchillas de metal se exploró el potencial de las cuchillas de vidrio encontrando, resultados bastante satisfactorios, además las mismas se preparaban con bastante facilidad y rigidez a partir de barras de vidrio, luego se sugirió el uso de cuchillas preparadas de minerales duros como rubíes, zafiro y diamante, pero tomó 15 años para que Fernández Morán lograra desarrollarlas a nivel comercial con calidad reproducible (Mercer y Birbeck, 1979).

4.1. Cuchillas de diamante. El científico Humberto Fernández Morán en el año 1953, fue el primero en diseñar e introducir las cuchillas de diamante para MET, el desarrolló un método de esmerilado y pulido de diamantes industriales para obtener filos agudos y, suficientemente fuertes para emplearse en seccionamiento ultrafino. En la actualidad, cuchillas de diamante de buena calidad pueden obtenerse de gran variedad de compañías como DDK, Dia-Tech, Diatome (ver Figura 3), Microstar, RMC Inc, Sumitome, Spi, etc.

Con una cuchilla de diamante se pueden obtener cortes finos de material (biológico y no biológico) de casi todos los grados de dureza o suavidad, siempre y cuando las muestras se encuentren bien incluidas en las resinas. Su uso ha sido demostrado en el corte de materiales extraordinariamente duros como metales, cerámica, madera, cartílago y hueso (Mercer y Birbeck,

1979). Las cuchillas de diamante son más convenientes que las de vidrio por ser más duras y porque permiten obtener un mayor número de cortes de calidad reproducible.



Figura 3. Cuchillas de diamante con su ángulo y su respectiva balsa, marca *Diatome*.

Es importante su uso en estudios en que debe obtenerse un gran número de cortes seriados, ya que cuando se trabaja con vidrio al reemplazarse la cuchilla la orientación del bloque respecto al filo de la cuchilla cambia. Las resinas epoxi y otras de mayor dureza se cortan mejor con cuchillas de diamante.

El ángulo incluido de las cuchillas de diamante debe conocerse. Las cuchillas de ángulo incluido relativamente agudo (45°) son eficientes para cortar muchos materiales biológicos y no biológicos. Las cuchillas de 35° permiten cortar muestras biológicas, polímeros y metales suaves. Los materiales duros, tales como algunos metales, se cortan mejor con cuchillas con un ángulo incluido menos agudo (55°) (ver Figura 3).

1.2. Cuidados de las cuchillas de diamante. En vista de que el filo de una cuchilla de diamante es extremadamente frágil, hay que tomar precaución al montar y retirar la cuchilla del ultramicrotomo. El primer paso es colocarla y sujetarla en la base porta cuchilla sin tocar el filo. La base porta cuchilla se monta cuidadosamente en el ultramicrotomo y se establece el ángulo de corte entre 2 y 5° . Muchas de las bases porta cuchilla vienen con una escala graduada para facilitar la fijación de este ángulo.

El filo puede mellarse por golpes accidentales contra una superficie de metal, con objetos como el bloque, las herramientas, las agujas de las jeringas, las micropinzas y las rejillas. Varios tipos de partículas y microchispas de las hojas de afeitarse (que pueden quedarse en el bloque durante el tallado) pueden dañar la cuchilla; para prevenirlo, la hojilla debe limpiarse con acetona u otro solvente antes de usarla y el bloque debe examinarse bajo un estereoscopio antes de cortar. Un ángulo de corte diferente al recomendado por el fabricante puede mellar el filo de la cuchilla.

El usuario de la cuchilla de diamante al finalizar su actividad debe limpiarla inmediatamente después de usarla, mientras la balsa aún está húmeda. Si uno de los últimos cortes se seca sobre el

diamante será muy difícil removerla, la cual evitará que el filo se humedezca en forma apropiada.

Se requiere lavar la balsa con acetona o alcohol seguido por un enjuague final con agua destilada, para remover el polvo o la basura, si estos permanecen en la balsa los cortes se contaminarían. Una cuchilla sucia produce muchas marcas en los cortes sin estar mellada, puede limpiarse con detergente líquido, seguido por enjuagues con mucha agua destilada.

2. Tallado y preparación de la cara del bloque. El tallado siempre es necesario ya que los cortes se obtienen de una porción muy pequeña del bloque. El bloque se talla después de montarlo en el portabloque y este debe montarse en la base del ultramicrotomo. El proceso completo de tallado ha de realizarse bajo el estereoscopio. La mayoría de los plásticos, pueden tallarse empleando hojillas industriales o de afeitarse.

Durante el tallado deben evitarse los cortes profundos y agudos, para que los mismos sean cortados, y facilitar que el bloque tome forma de pirámide truncada (véase la Figura 4), con un semiángulo cercano a los 50° . Durante el seccionamiento la cara en forma de trapecio se sostiene mejor que cualquiera de las otras formas (rectangular, triangular) y las hileras se forman más fácilmente si el lado inferior es levemente mayor que el lado superior, aunque una cara rectangular es aceptable.

El tamaño más deseable de la cara del bloque no debe exceder de 0,5 mm de lado, sin embargo secciones de buena calidad se pueden obtener de caras grandes (1-2 mm de lado) (Moreira, 1994). Al cortar se produce un aumento de la cara del bloque. Es aconsejable recortar la cara después de haber obtenido un número considerable de cortes.

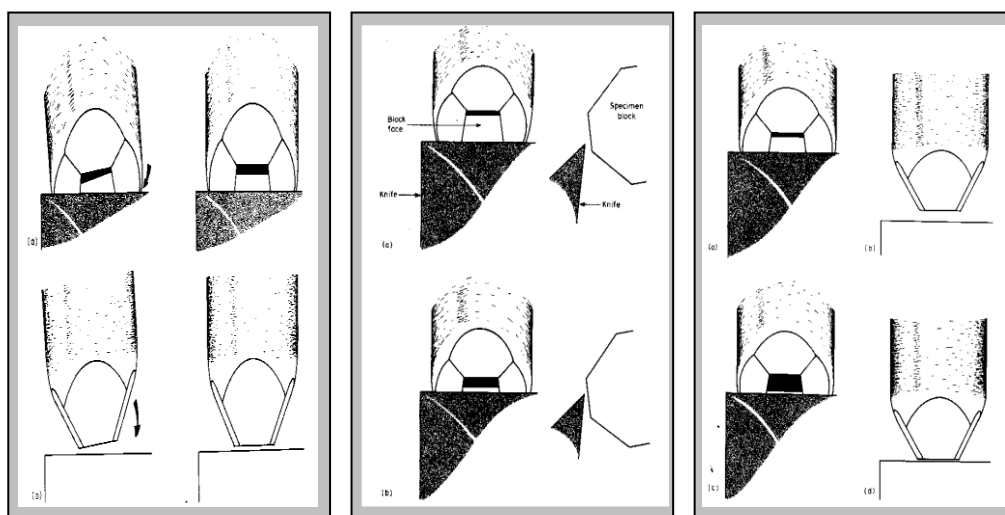


Figura 4. Tallado o formación de la pirámide truncada del bloque: (a) vista longitudinal, (b) vista transversal.

5.1. Montaje del bloque. El bloque ha de alinearse de manera tal que el eje mayor de la cara esté paralelo al filo de la cuchilla. Si la cara del bloque es trapezoidal, el lado paralelo más corto se orienta hacia arriba, cada corte mueve al otro alejándolo del filo y facilitando la formación de series rectas.

Hay que mantener el bloque firme en el portamuestra y no sobresalir más de pocos milímetros del extremo frontal de su borde. Las cuchillas y los bloques flojos son los errores más

comunes (Figura 5).



Posición incorrecta

Posición correcta

Figura 5. Posiciones bloque tallado-cuchilla durante la obtención de los cortes en el ultramicrotomo (Reid y Beesely, 1991).

Es recomendable revisar en forma periódica, después de recoger una o dos rejillas para asegurarse que el bloque continúa retenido firmemente. No es raro que un bloque ajustado con firmeza se afloje después de obtener varios cortes. Con frecuencia, los bloques flojos son la causa de cortes defectuosos, cortes gruesos y delgados, grosor irregular y arrugas en los cortes.

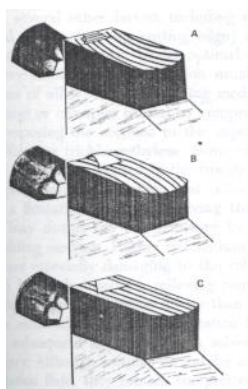
6. Líquido de flotación. El agua destilada es lo más recomendable para llenar la balsa de la cuchilla donde se recogerán los cortes de los materiales plásticos. Aunque los cortes se pueden exponer brevemente a vapores de disolventes para liberarlos de la compresión. La ventaja de usar agua destilada es que las secciones pueden permanecer flotando durante períodos largos sin exponerlas a la acción degradante de un disolvente.

6.1. Flotación de los cortes. Antes de iniciar el proceso de corte, la balsa de la cuchilla debe estar húmeda hasta el filo; condición necesaria no sólo para obtener cortes intactos sino para facilitar la liberación de los cortes del filo cuando el siguiente empieza a cortarse. Una tensión superficial relativamente baja impide que el líquido de flotación cubra el espacio entre el corte y la balsa de la cuchilla. Por otro lado, con tensión superficial alta, los cortes empujan el líquido de flotación hacia el extremo final de la balsa de la cuchilla, produciendo un filo seco que hace que los cortes se adhieran al mismo.

La humedad del filo está relacionada directamente a la forma del menisco del líquido en la balsa (ver Figura 6). Un menisco convexo tiende a sobre humedecer el filo, humedeciendo la cara del bloque. Cuando esto ocurre, la base del filo también toma algo del líquido y se hace improbable

obtener cortes. Por otro lado, un menisco cóncavo no humedece hasta el final la balsa, por lo que los cortes se adhieren a la cuchilla. La humedad óptima del filo se alcanza cuando el menisco es casi plano (Hayat, 1970).

El nivel del menisco inicial se obtiene creando un menisco convexo y luego uno cóncavo, drenando gradualmente el líquido hasta que se observe un leve secado del filo. El ajuste del nivel del menisco se logra mientras se observa a través del estereoscopio. Si el filo está limpio y el nivel del menisco es el óptimo, los cortes se alejarán fácilmente. Durante el proceso de corte debe mantenerse el nivel óptimo del menisco, esto se logra agregando o retirando pequeñas cantidades de agua, para observar el color de interferencia de los cortes, así como para la recolección de los mismos.



A.- Un menisco cóncavo puede causar arrugamiento de los cortes.

B.- Un menisco convexo puede humedecer la cara del bloque.

C.- Un menisco plano, permite que se humedezca de manera apropiada el filo de la cuchilla.

Figura 6. Diferentes formas que puede tomar el menisco del líquido en la balsa (Hayat, 1970).

6.2. Recolección de los cortes. La recolección de los cortes de la balsa requiere considerable cuidado y destreza técnica. Los dos requisitos más importantes para la recolección eficiente son: que los cortes estén en el centro de la rejilla y que no se superpongan uno con otro. Si los cortes forman una serie, casi se elimina la posibilidad de superposición durante su transferencia razón por la cual la formación de series es importante. En caso de cortes dispersos, deben agruparse hacia el centro, creando pequeñas ondas en el líquido de la balsa con un palito provisto de una pestaña.

Una forma simple de recolectar los cortes es acercar la rejilla sobre la superficie de la serie. Mientras los cortes son recogidos, la rejilla necesita presionarse levemente hacia abajo en la balsa, tan pronto la rejilla toca los cortes éstos son atraídos (debido a la carga electrostática) portando una pequeña gota de líquido (Figura 7a).

En ocasiones la atracción no sólo quiebra la serie de cortes sino que también obstaculiza el control de la orientación y el centrado de los mismos en la rejilla. Un método alternativo para recolectar los cortes es sumergir la rejilla y luego recoger los cortes desde abajo (Figura 7b). Entre las

desventajas del método están el que los cortes son dispersados por el movimiento hacia arriba y que para centrar los mismos sobre la rejilla se requiere bastante dominio de la técnica.

Las principales dificultades en la preparación de cortes seriados no reside en su obtención, ya que los ultramicrotomos producen series fácilmente, sino más bien en su transferencia sin arrugas y el alineamiento sobre las rejillas para que estén sostenidas adecuadamente y su observación no se vea obstruida por las barras de la rejilla.

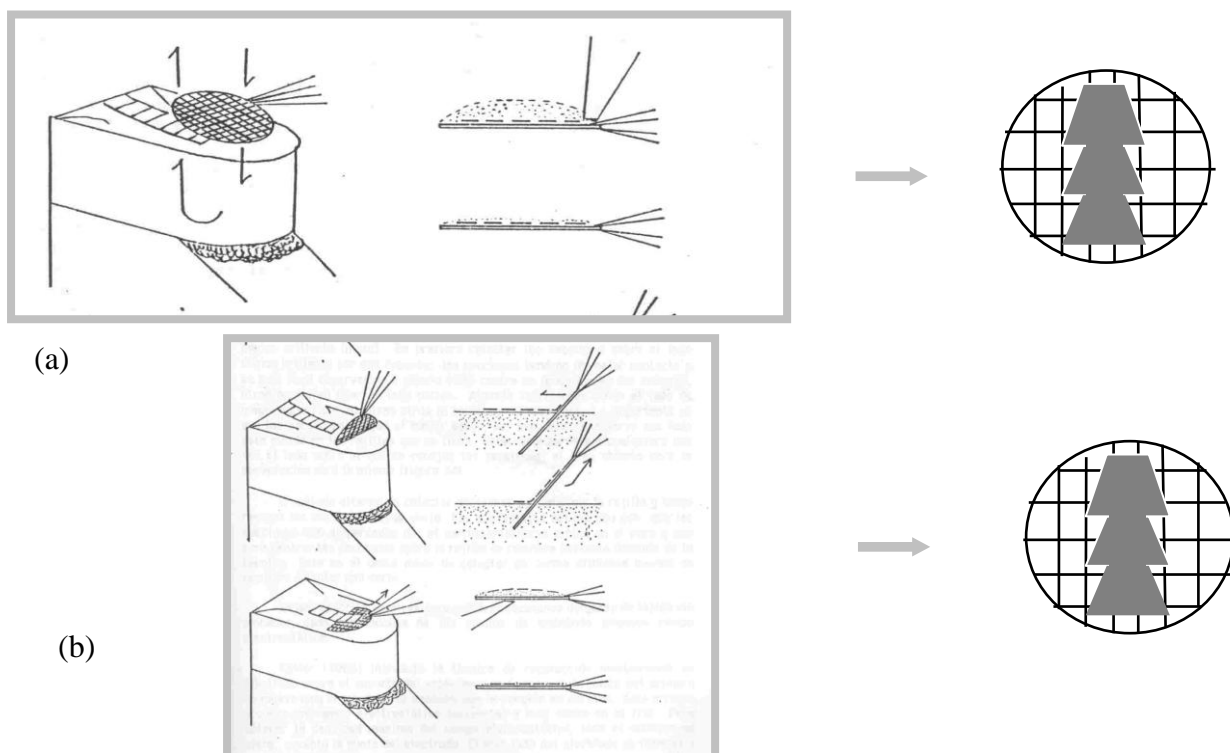


Figura 7. Formas de recolectar una serie de cortes: (a) acercar la rejilla a la superficie de la balsa y presionarla o (b) sumergir la rejilla y luego recoger los cortes desde abajo (Hayat, 1970).

7. Tipos de rejillas. Para el montaje de los cortes existen rejillas de muchos modelos, se debe elegir el que más se adapte a la investigación que se esté realizando (Figura 8). Las rejillas se construyen de diferentes materiales, las más comunes son de cobre, níquel o carbón, el diámetro estándar de todas es de 3 mm. Se suelen guardar o transportar en placas o cajas especiales (porta rejillas).

Los cortes de resina polimerizada son consistentes y no necesitan películas de soporte (membranas) sobre las rejillas. Las membranas reducen el contraste e introducen artificios, es difícil eliminar burbujas de aire, contaminación y partículas de polvo de las membranas. Por tanto, su uso se evita al máximo prefiriéndose emplear rejillas sin membranas de soporte, a menos que sea absolutamente necesario.

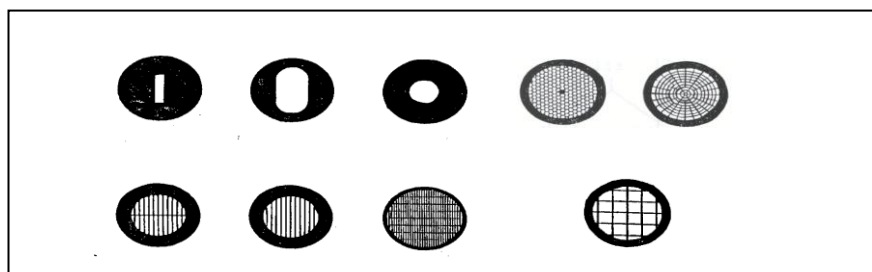


Figura 8. Diferentes formas de las rejillas que se usan para recolectar los cortes que van al MET.

Una forma de crear soporte en las rejillas es sumergirlas en *colodión* (acetato de celulosa al 0,2 – 0,4%) y luego transferirlas sobre papel de filtro para eliminar los excesos. Para emplearlas debe esperarse hasta que se evapore el disolvente.

Las rejillas deben manipularse con mucho cuidado antes, durante y después que los cortes se han colectado. Deben protegerse durante su manipulación de daños tales como dobleces o pliegues. Cualquier daño puede afectar la calidad de las mismas y la imagen que se logre ya que los cortes serán tan planos como lo sean las rejillas a las que están unidos.

8. Observación de los cortes (estereoscopia binocular). Durante el proceso de corte la observación continua es necesaria para asegurar el nivel del menisco deseado en la balsa mientras se corta y transfieren los cortes, así como para detectar imperfecciones como marcas de cuchilla.

Por ello, es necesario un sistema para visualizar los cortes: aumentos de 10 a 80X, 50° respecto al filo de corte y lámpara fluorescente cerca del lente objetivo con ángulo apropiado para obtener la reflexión de la luz sobre el agua.

Tan pronto se detecte alguna imperfección en los cortes, debe detenerse el proceso, revisar y corregir. El defecto que parece pequeño bajo el binocular, aumentara considerablemente en el MET.

9. Contrastación de los cortes. La fase previa a la observación de los cortes al MET, consiste en conferir contraste a los cortes obtenidos. Para eso se utilizan soluciones de sales de metales pesados (citrato de plomo y acetato de uranilo), los cuales contienen iones de alto número atómico, es decir con un importante número de electrones y protones capaces de desviar el haz de electrones incidentes sobre la muestra. Esto se logra colocando las rejillas con los cortes hacia abajo por 10 minutos a temperatura ambiente y luego se lavan con abundante agua destilada.

Hay que tomar precauciones porque muchos cortes suelen contaminarse con varias clases de precipitados que se forman durante el proceso de contrastación de los cortes, o con partículas de polvo y películas de grasa que pueden también introducirse en este paso.

10. Diferentes fuentes de los artificios más comunes. Uno de los artificios más comunes en los cortes son los derivados de la vibración. El término vibración se usa para describir todas las variaciones periódicas que se observan en un corte, que muestra zonas alternas de compresión y

zonas de buen corte.

Se observan en ocasiones como bandas paralelas al filo mientras se está cortando. Este defecto se distingue fácil de las marcas presentes en el corte debido a mellas o basuras en el filo. Las marcas de vibración tienden a encubrirse una con otras, mientras que las marcas de la cuchilla son profundas y abruptas, acompañadas por desprendimiento de pequeñas regiones. Además, las marcas de la cuchilla son perpendiculares al filo y aparecen en número menor, a menos que el daño de filo de la cuchilla sea considerable. La Figura 9 detalla algunos de los defectos más frecuentes que se presentan cuando se trabaja con el ultramicrotomo (Reid y Beesely, 1991).

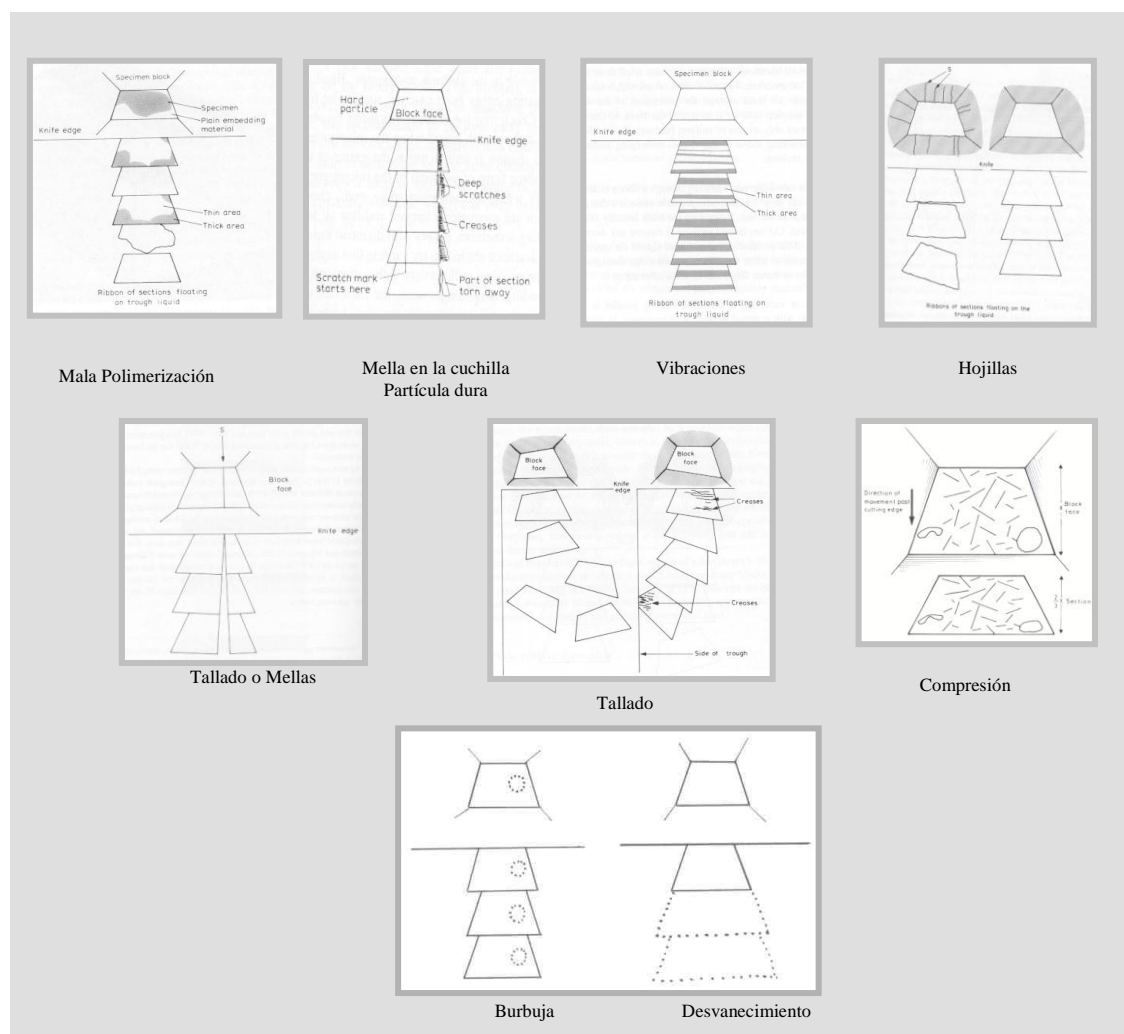


Figura 9. Problemas más frecuentes que se presentan cuando se trabaja con el ultramicrotomo.

Se considera que la principal causa de los defectos que genera la vibración la producen los componentes del ultramicrotomo, la cuchilla, el bloque o el brazo del ultramicrotomo. En el segundo tipo de defectos, es probable que el grosor y la periodicidad de las bandas se relacionen con la condición del filo de la cuchilla así como con la dureza y elasticidad del plástico y la muestra. Durante el corte la capa superficial del bloque es comprimida por el impacto de la cuchilla

y a partir de esta capa comprimida se realizan los siguientes cortes. El grado de compresión depende del plástico y sus propiedades elásticas, si el bloque es relativamente suave se comprimirán tanto que ningún corte podrá obtenerse. Por otro lado, un bloque muy duro induce mayor impacto y tensiones de corte, las estructuras rígidas y densas en electrones son aún más susceptibles a este tipo de vibraciones.

No se ha determinado todas las posibles fuentes de vibraciones, dentro de las que se conocen están: ángulo de ataque muy grande, ángulo de la cuchilla demasiado grande, velocidad de corte muy rápida, cara del bloque demasiado grande, alta temperatura en el laboratorio, bloque demasiado lejos del punto de soporte, altura de la cuchilla inapropiada, cuchilla desafilada, posición incorrecta del bloque respecto al filo, forma incorrecta del tallado, bloque demasiado duro, muy suave y elástico, cuchilla sostenida en forma incorrecta, cambios de temperatura repentinos en la vecindad inmediata del instrumento, etc.

Una estricta observación de rutina es necesaria para prevenir que los cortes no recojan polvo. Las fuentes de esta clase de contaminación incluyen: el filo de la cuchilla, el líquido de flotación, las rejillas, el contenedor de las rejillas, las puntas de las pinzas, las membranas de soporte, la balsa de la cuchilla entre otros. No debe asumirse que aunque las rejillas parezcan limpias ellas están libres de polvo. Todas las rejillas deben lavarse en acetona pura antes de usarse y mantenerse cubiertas todo el tiempo. El proceso de corte debe llevarse a cabo en un cuarto relativamente libre de polvo, ya que el líquido de flotación recoge el polvo del ambiente con facilidad.

Las fuentes de contaminación por grasa o películas de aceite son semejantes a las mencionadas para el polvo: líquido de flotación, la cara del bloque, la cuchilla, las jeringas o pipetas, las rejillas y sus contenedores, la balsa, los dedos, estornudos. Como regla general, los dedos nunca deben tocar los objetos o sustancias que se ponen en contacto directo con los cortes.

11. La ultramicrotomía en el análisis por MET de los materiales polímeros.

11.1. Análisis de tamaños lamelares en copolímeros de etileno modificados. Se analizaron copolímeros de etileno comerciales, tres de polietileno de alta densidad (PEAD1, PEAD2 y PEAD3) y un polietileno lineal de baja densidad (PELBD). Los comonomeros y su contenido (% mol) fueron: 1-buteno (PEAD1); 1-hexeno, 0,8% (PEAD2); 1-buteno, 0,35% (PEAD3); y 1-buteno, 3,41% mol (PELBD), respectivamente. Los PEAD y el PELBD se funcionalizaron (PEAD1F, PEAD2F, PEAD3F, PELBDF) con dietil éster del ácido maleico (DEM) en disolución.

Para el análisis morfológico, los PE se sometieron a tres diferentes tratamientos de cristalización. El primero consistió en cristalizar los PE en un Calorímetro Diferencial de Barrido

(DSC-7), después de ser encapsulados en aluminio y mantenidos a 160°C por 30 minutos en el equipo. La cristalización se realizó enfriando las muestras con una velocidad de barrido de 10 grado/minuto entre 160 y 25°C. El segundo tratamiento consistió en mantener las muestras a 120°C por 24 horas en aceite de silicona, y luego enfriarlas en acetona bruscamente. El tercer tratamiento fue isotérmico similar al anterior pero una vez transcurridas las 24 horas, se dejó que las muestras enfriaran lentamente hasta que alcanzaran la temperatura ambiente. En todas las muestras se evaluó la morfología lamelar en un microscopio electrónico de transmisión (MET) (Prin et al., 2004).

Para poder observar las muestras tratadas térmicamente en el MET, es necesario aumentar el contraste en las mismas, de manera que para los polietilenos de los tres tratamientos una lámina o un extremo del disco extraído de las capsulas del DSC, fue cortado en forma piramidal en un ultramicrotomo *Reichert-Jung*, modelo *Ultracut E*. Posteriormente, la lámina cortada, se colocó en HClSO_3 durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el polímero fue lavado con acetona y llevado al ultramicrotomo, de donde se obtuvieron cortes finos (90 nm), cortados a una rapidez de 1 mm/s. Finalmente los cortes se contrastaron con acetato de uranilo al 2%, se lavaron con agua destilada y las muestras fueron observadas en un MET *Hitachi*, modelo H-600, a 100 kV. Por medio de esta técnica se logró la incorporación de grupos sulfonilos a la fase amorfa presente en el polímero, aumentando su densidad electrónica y mejorando el contraste en la muestra.

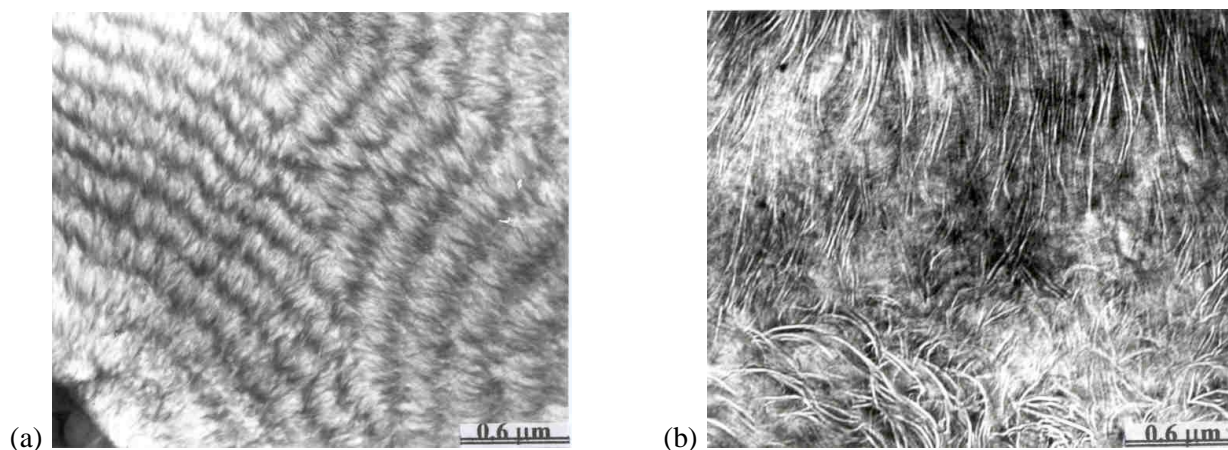


Figura 10. Morfología lamelar: (a) de PEAD3 con tratamiento isotérmico seguido por enfriamiento brusco y (b) de PEAD2-f-DEM con tratamiento dinámico en el DSC, enfriado a 10 grado/min.

La estimación del tamaño de las lamelas en los polietilenos modificados y sin modificar, y su distribución se realizó mediante la elaboración de histogramas de distribución de tamaños de dichos cristalitas, en base a 200 medidas tomadas a partir de cada uno de los negativos de las microfotografías de las muestras obtenidas por MET. Para ello las micrografías fueron divididas en cuadrantes iguales. Cada histograma se construyó en promedio con 600 medidas aproximadamente

(3 micrografías por muestra) de los espesores lamelares para cada polímero.

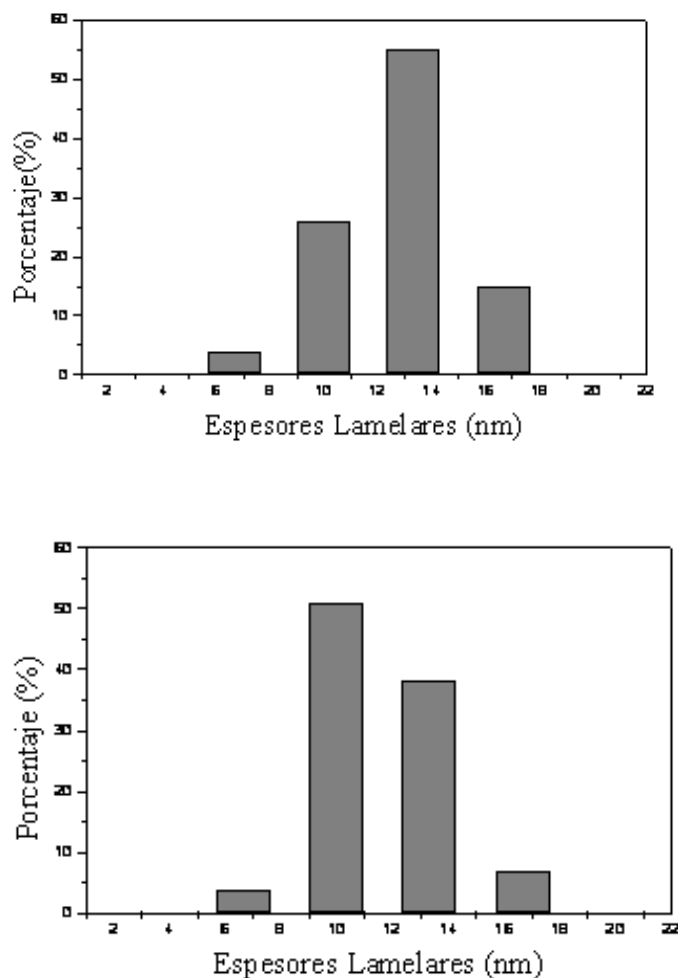


Figura 11. Distribución de espesores lamelares en PEAD1 (a) antes y (b) después de la funcionalización, con tratamiento isotérmico seguido de enfriamiento lento [9].

La morfología lamelar fue observada en el MET para todos los polímeros estudiados (ver Figura 10). Independientemente del tratamiento térmico utilizado se pudieron establecer diferencias en las distribuciones de espesores lamelares de los polietilenos de partida y los funcionalizados, tal como se observa en los histogramas de la Figura 11. Las poblaciones lamelares de mayor espesor de los PE originales tienden a disminuir o a desaparecer con la funcionalización. Estas variaciones indican que la funcionalización tiende a afectar las secuencias de etileno cristalizables que son las que definen el tamaño del espesor lamelar.

Agradecimientos. Agradecemos al FONACIT, CI-UDO (N° CI-5-1902-116/03) y a OPSU-Proyecto POA 15.1/2008 por los recursos otorgados, que permitieron la adquisición de los materiales, equipos, servicios y traslados necesarios para hacer estos trabajos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://biologiacelularb.com.ar/joomlaespanol/images/diagramas/u3tamrelat.jpg>
2. Hayat MA “*Principles and Techniques of Electron Microscopy*”. Volumen 1, 1970.
3. Hernández G “*Polímeros: Características, Propiedades y Nuevas Aplicaciones*”. Escuela Internacional de Polímeros. V Sesión. Congreso Instruccional y Divulgativo. VII. Curso de Aplicación en Polímeros. Mérida, Venezuela 2004
4. Mercer EH, Birbeck BM “*Manual de Microscopía para Biólogos*”, 1979.
5. Moreira L “*Conceptos sobre ultramicrotomía*”. Unidad de Microscopía Electrónica. Universidad de Costa Rica, 1994
6. Omior RE, Lloyd PF, Proceeding of the 4th Anual Meeting of the Electron Microscopy Society of America, 1989
7. Reid N, Beesly J. “*Sectioning and Cryosectioning for Electron Microscopy*”. Volumen 13, 1991.
8. Rojas de Gáscue B “*Memorias del VI Curso de Aplicación: Tecnología y Caracterización de Polímeros mediante DSC y Microscopía Electrónica de Transmisión*”, Cumaná, Venezuela 2003
9. Prin JL, Rojas de Gáscue B, Hernández G, Reyes Yaruma y Puig C, *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, **24** (1), 3 (2004)