

## Artigo

**Microscopia Analítica como Ferramenta no Estudo de Sedimentos**

Miguens, F. C.;\* Oliveira, M. L.; Marins, R. V.; Lacerda, L. D.

Rev. Virtual Quim., 2011, 3 (2), 60-67. Data de publicação na Web: 8 de junho de 2011

<http://www.uff.br/rvq>**Analytical Microscopy as a Tool in Sediments Study**

**Abstract:** Historically, microscopes were used for descriptions of animals, plants and non-living specimens. In 19<sup>th</sup> century, the shape-function relationship marked microscopic studies. The later 20<sup>th</sup> century witnessed the nanometric special resolution provided by electron microscopes. As we enter the 21<sup>st</sup> century, the analytical electron microscopy promises to change our comprehension about the nano-world. Chemical analyses of the shape will redesign our understanding of the structure and functioning of animals, plants and non-living specimens, including sediments.

**Keywords:** Scanning Electron Microscopy; Sediments; X-Ray spectrometry.

**Resumo**

Historicamente, microscópios foram usados para descrever animais, plantas e espécimes abióticos. No século XIX, os estudos de microscopia eram marcados pela relação forma-função. A segunda metade do século XX testemunhou a resolução nanométrica fornecida pelos microscópios eletrônicos. Neste início do século XXI, a microscopia analítica promete alterar nossa compreensão sobre o mundo nanométrico. As análises químicas da forma irão redesenhar nosso conhecimento sobre a estrutura e o funcionamento de animais, plantas e espécimes abióticos, inclusive sedimentos.

**Palavras-chave:** Espectrometria por energia dispersiva de Raios-X; Microscopia Eletrônica de Varredura; Sedimentos.



\* Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Avenida Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, 28.013-600, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Telefone: +55.22.27397029 Fax: +55.22.27397178.

✉ [flaviomiguens@gmail.com](mailto:flaviomiguens@gmail.com)

DOI: [10.5935/1984-6835.20110011](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110011)

## Microscopia Analítica como Ferramenta no Estudo de Sedimentos

Flávio C. Miguens,<sup>a,\*</sup> Martha L. de Oliveira,<sup>b</sup> Rozane V. Marins,<sup>c</sup> Luiz D. de Lacerda<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Avenida Alberto Lamego, 2000 – Parque Califórnia. 28.013-600 – Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro – Brasil.

<sup>b</sup>Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Avenida Alberto Lamego, 2000 – Parque Califórnia. 28.013-600 – Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro – Brasil.

<sup>c</sup>Instituto de Ciências do Mar - Universidade Federal do Ceará (UFC). Av. da Abolição, 3207, Meireles, 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil.

<sup>d</sup>Departamento de Geoquímica - Universidade Federal Fluminense. Instituto de Química, Campus Valonguinho, 24020-150, Niterói, RJ, Brasil.

\*[flaviomiguens@gmail.com](mailto:flaviomiguens@gmail.com)

*Recebido em 3 de maio de 2011. Aceito para publicação em 8 de junho de 2011*

### 1. Introdução

### 2. Microscopia Eletrônica de Varredura associada à Microanálise de Raios-X

### 3. Microscopia analítica de sedimentos

### 4. Carbonato de cálcio em sedimentos por SEM/EDS

### 5. Perspectivas da Microscopia Analítica no contexto da Transferência de Materiais na Interface Continente-Oceano

### 6. Conclusões

## 1. Introdução

Há aproximadamente quatro séculos a microscopia fascina leigos e cientistas. (*Micrographia* by Robert Hooke: <http://www.gutenberg.org/ebooks/15491>). Durante os séculos XVII, XVIII e XIX, as descrições da morfologia externa e interna de seres vivos e materiais dominaram o universo de desenhos e imagens. No século XIX, diversas vertentes mudam definitivamente a utilização desta ferramenta, concretizando o binômio forma-função.

As descrições morfológicas têm um cunho marcadamente fisiológico, ou seja, uma determinada forma está relacionada com uma determinada função; obviamente, não envolvendo análises evolutivas.

A microscopia de luz (microscopia óptica) gera imagens reais, que podem ser captadas por um anteparo, resultantes da interação de um feixe de luz visível com um objeto. O resultado desta interação atravessa lentes que ampliam a imagem, gerando uma imagem aumentada dos espécimes (para tutorial interativo: <http://www.olympusmicro.com/primer/java/index.html>).

Os avanços na área da microscopia sempre estiveram ligados ao desenvolvimento de equipamentos focados em características relacionadas à visão humana. As principais são contraste e resolução. A visão humana distingue contraste de intensidade, ou seja, é capaz de identificar diversos tons de cinza entre a cor branca e a preta; e também, é capaz de identificar as cores do espectro visível da luz: violeta, anil, azul, verde, amarelo, laranja e vermelho. Em uma abordagem

simples, a resolução de um sistema óptico como o olho humano é traduzida como a distância mínima entre dois objetos que permite que eles sejam visualizados individualmente. Para a maioria das pessoas esta distância é de 0,2 mm ou 200 micrômetros (200  $\mu\text{m}$ ). Em verdade, microscópios são ferramentas que geram imagens reais que amplificam a resolução do olho humano. Na microscopia de luz, em função do comprimento de onda da radiação, que varia entre 400 nanômetros (azul) e 700 nanômetros (vermelho). Assim, a resolução do olho humano pode ser ampliada aproximadamente 1.000 vezes. Em outras palavras, permite ao observador distinguir objetos que distem, entre si, 0,2 micrômetros ou 0,0002 mm .

Em relação ao desenvolvimento de equipamentos, é um exemplo marcante a união de esforços de Carl Zeiss (industrial), Ernest Abbe (físico) e Otto Schott (químico), na Alemanha do século XIX, produzindo microscópios com avanços qualitativos relevantes; como a introdução de lentes que condensam a luz incidente nas amostras por Abbe e a qualidade da matéria-prima empregada na fabricação das lentes por Schott. Paralelamente, na área biológica são desenvolvidas *colorações* diferenciais. Os trabalhos do médico italiano [Camilo Golgi](#) utilizando impregnações com prata no estudo de células e tecidos, e os do espanhol Ramon Cajal que com seus estudos sobre o tecido nervoso geraram as bases da Teoria Neuronal. Estes pesquisadores lançaram as bases da histoquímica, isto é, a utilização de substâncias que impregnam diferencialmente componentes de células e tecidos. Em decorrência, desenvolveram-se métodos que utilizam anticorpos para localizar, através de reações imunológicas, componentes de células e tecidos. Atualmente, a histoquímica e a imunocitoquímica são ferramentas extremamente úteis em diagnóstico clínico de diversas doenças e na pesquisa científica.

O conhecimento de que partículas subatômicas - elétrons - podem ser focadas por campos magnéticos em condições de atmosfera extremamente rarefeita, ditas condições de vácuo e que os elétrons trafegam no vácuo com comprimentos de onda de 10.000 a 100.000 vezes menores que os da luz visível foram os propulsores para o desenvolvimento de microscópios

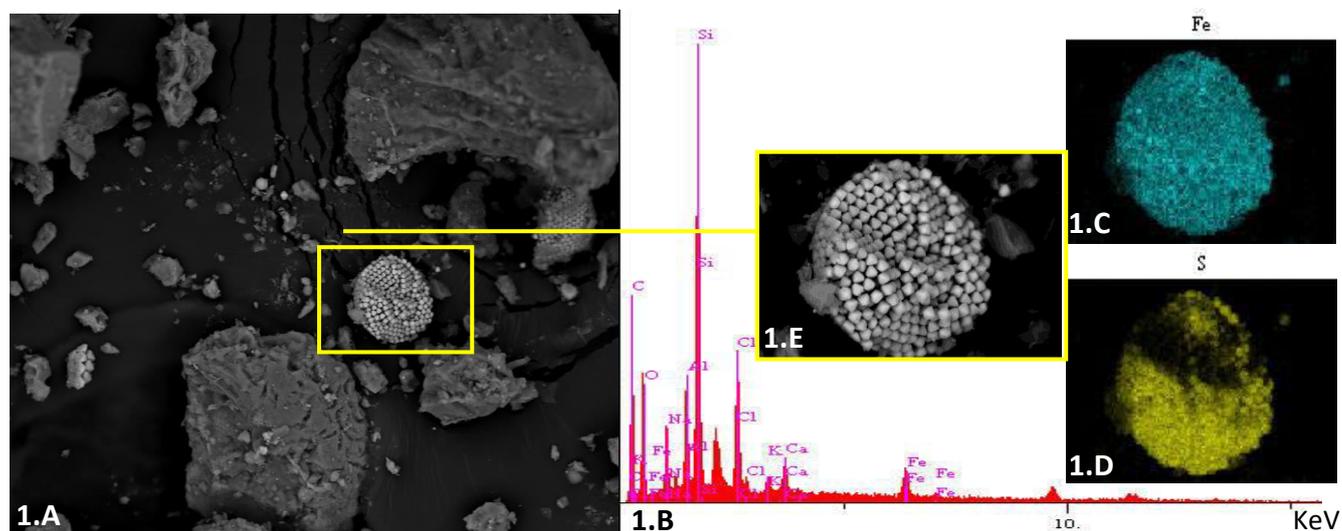
de elétrons, usualmente conhecidos como microscópios eletrônicos. Em teoria, são ferramentas que ampliam a resolução do olho humano da ordem de um milhão de vezes. Por exemplo, um observador ao analisar uma fotografia ou uma imagem obtida em um microscópio eletrônico com um aumento de 100.000 vezes poderá identificar (*resolver*) estruturas da ordem de 0,000002 milímetros.

Em 1932, Ernest Ruska e Max Knoll desenvolveram o primeiro microscópio eletrônico, ainda um modelo laboratorial. Curiosamente, os esforços de Ruska só foram reconhecidos em 1986, quando ele foi agraciado com o Prêmio Nobel de Física. Em 1939, a Siemens Corporation lançou comercialmente o primeiro microscópio eletrônico de transmissão. Obviamente, a barbárie da II Guerra Mundial retardou a utilização científica destes equipamentos por praticamente 10 anos. Os microscópios eletrônicos de varredura, originalmente desenvolvidos por Manfred von Ardenne em 1938, apareceram comercialmente em 1958 com o lançamento pela Cambridge Instruments do equipamento Stereoscan.

Em 1977, foi publicada a primeira revisão sobre Microscopia Eletrônica de Transmissão em Ciências da Terra<sup>1</sup>; na qual é enfatizada sua abrangência em mineralogia e geologia, não só por amplificar a resolução dos microscópios de luz como por fornecer informações de difração. A microscopia analítica é uma ferramenta extremamente útil por associar a resolução espacial com a análise química obtida por espectrometria de Raios-X.<sup>2-6</sup>

## 2. Microscopia Eletrônica de Varredura associada à Microanálise de Raios-X

Desde os anos de 1970, a microscopia eletrônica de varredura associada à microanálise de Raios-X (Figura 1) vem se estabelecendo como ferramenta essencial no estudo de rochas sedimentares, sedimentos e solos devido a sua característica primordial de associar a morfologia destas estruturas com a análise química<sup>2-4</sup>

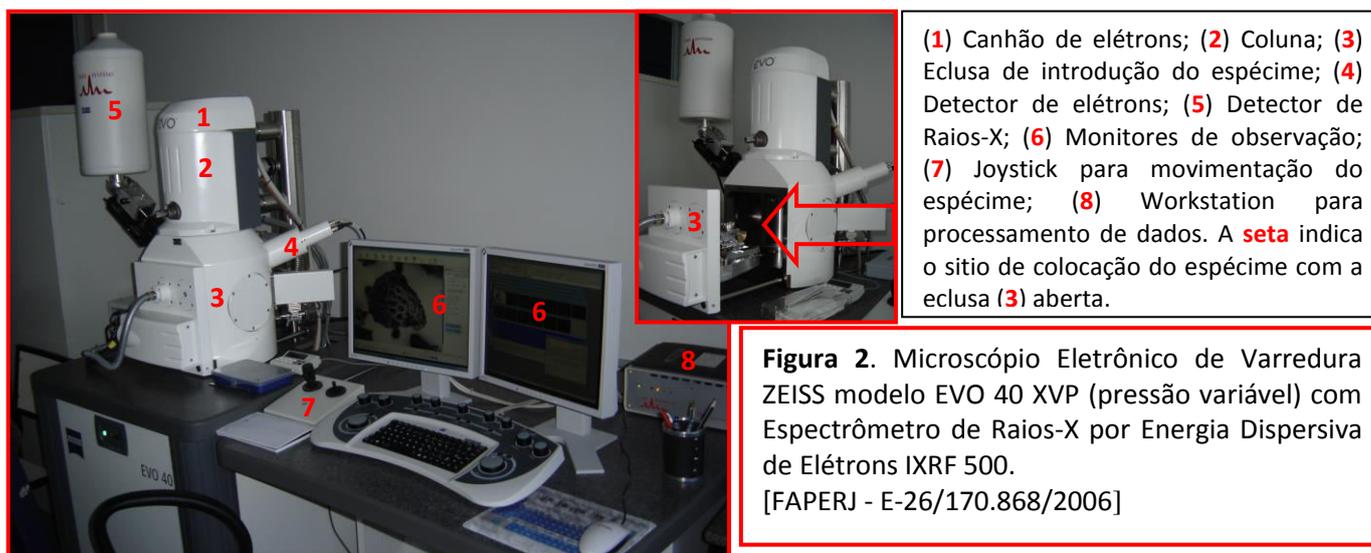


**Figura 1.** Imagem de sedimento do estuário do Rio Jaguaribe, Ceará, coletado a 70 centímetros de profundidade do leito do rio. Morfologia das partículas e agregados presentes no sedimento (1.A). Espectro de energia dispersiva de Raios-X dos elementos químicos presentes na área observada (1.B). Framboide de pirita (Figuras 1 e 1.E) identificado pela morfologia e mapas de distribuição de Ferro (1.C) e de Enxofre (1.D)

Obviamente, surge imediatamente ao leitor a pergunta: Como esta ferramenta funciona? Cabe, então, uma breve descrição de microscopia eletrônica de varredura associada à espectrometria de Raios-X por energia dispersiva de elétrons (<http://www.zeiss.com/nts>).

Em todo e qualquer microscópio as imagens são geradas a partir da interação da radiação eletromagnética (luz visível, no caso da microscopia

de luz) ou da partícula (no caso da microscopia eletrônica) com o espécime. Há no mercado, basicamente, dois tipos de microscópios eletrônicos de varredura: os que operam exclusivamente em condições de alto vácuo, da ordem de  $10^{-6}$  Torr, e os que operam em pressão variável no ambiente que o espécime é disposto no interior do equipamento ([Figura 2](#)).



**Figura 2.** Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS modelo EVO 40 XVP (pressão variável) com Espectrômetro de Raios-X por Energia Dispersiva de Elétrons IXRF 500. [FAPERJ - E-26/170.868/2006]

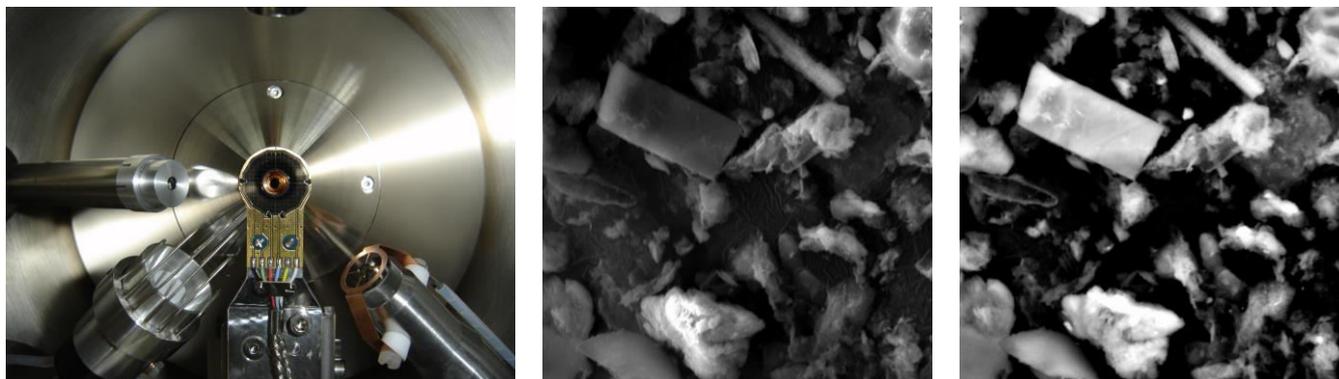
Descrevendo, sucintamente, as partes mencionadas: o **canhão de elétrons**, no qual o feixe de elétrons é gerado; o feixe de elétrons trafega pela **coluna** atravessando campos magnéticos (*lentes*) que diminuem seu diâmetro; **eclusa** para introdução do espécime e sítio em que o feixe de elétrons colide

com o espécime; **detectores** de elétrons secundários, de elétrons retroespalhados (backscattered electrons) e de Raios-X.

Os detectores são sistemas físicos que captam os sinais oriundos da interação do feixe de elétrons com o espécime. Os sinais importantes para a formação de

imagens são os elétrons secundários, que geram imagens com detalhamento do relevo; os elétrons backscattered, que além de gerarem imagens topográficas permitem a obtenção de imagens de composição, pela diferença de número atômico entre os elementos químicos, presentes no espécime, nas quais, quanto maior o número atômico do elemento

químico maior será a intensidade de sinal que será traduzido nas imagens por tons próximos ao branco; e, os Raios-X característicos que permitem identificar qualitativa e quantitativamente os elementos químicos presentes no espécime e gerar mapas de distribuição destes no espécime (Figura 3).



**Figura 3.** Fotografia do interior de Microscópio Eletrônico de Varredura, colocando o observador no porta espécime olhando no sentido do canhão de elétrons. (1) Detector de elétrons backscattered; (2) Detector de elétrons secundários em alto vácuo; (3) Detector de elétrons secundários em pressão variável; e, (4) Detector de Raios-X. Na imagem gerada por elétrons secundários (3.B) a ênfase é no relevo do espécime; enquanto que, na de composição por elétrons retroespalhados (3.C); nota-se o contraste de número atômico

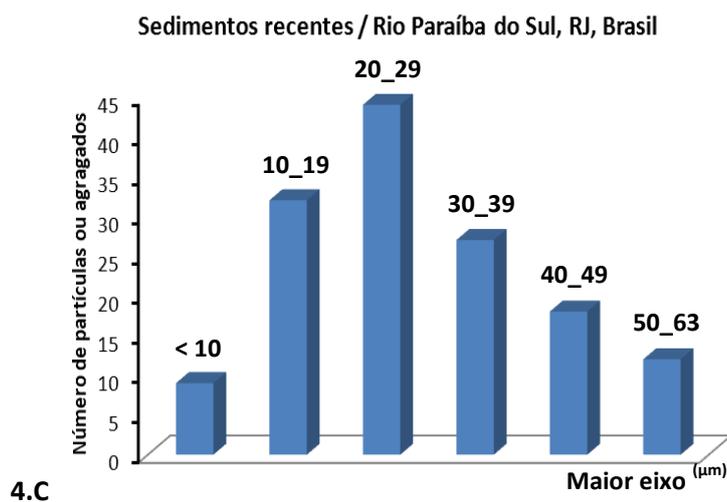
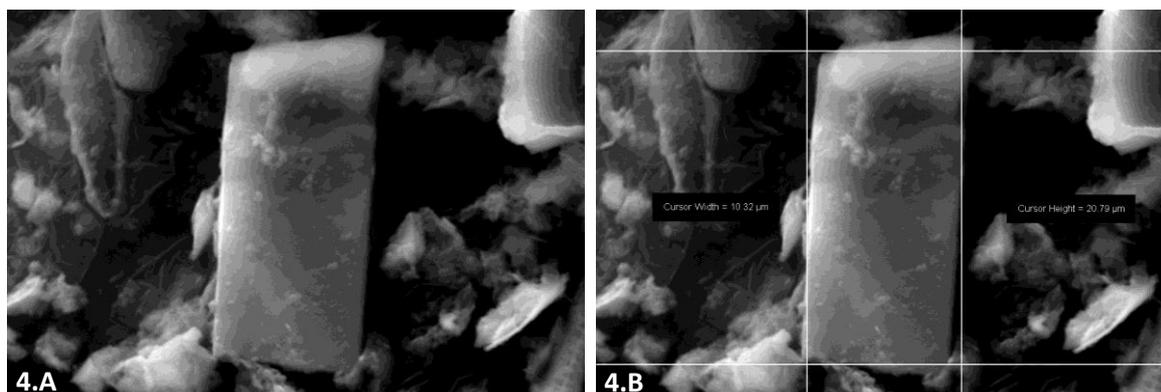
O emprego de Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectrometria de Raios-X por energia dispersiva de elétrons em mineralogia e geologia teve, recentemente, avanços significativos com o lançamento dos livros *Backscattered Scanning Electron Microscopy and Image Analysis of Sediments and Sedimentary Rocks*<sup>2</sup>, *Energy Dispersive Spectrometry of Common Rocks Forming Minerals*<sup>3</sup> e *Electron Probe Microanalysis and Scanning Electron Microscopy in Geology*<sup>4</sup> Estes livros são leitura obrigatória aos interessados em agregar uma ferramenta de monitoramento *in situ* à geoquímica ambiental.

### 3. Microscopia analítica de sedimentos

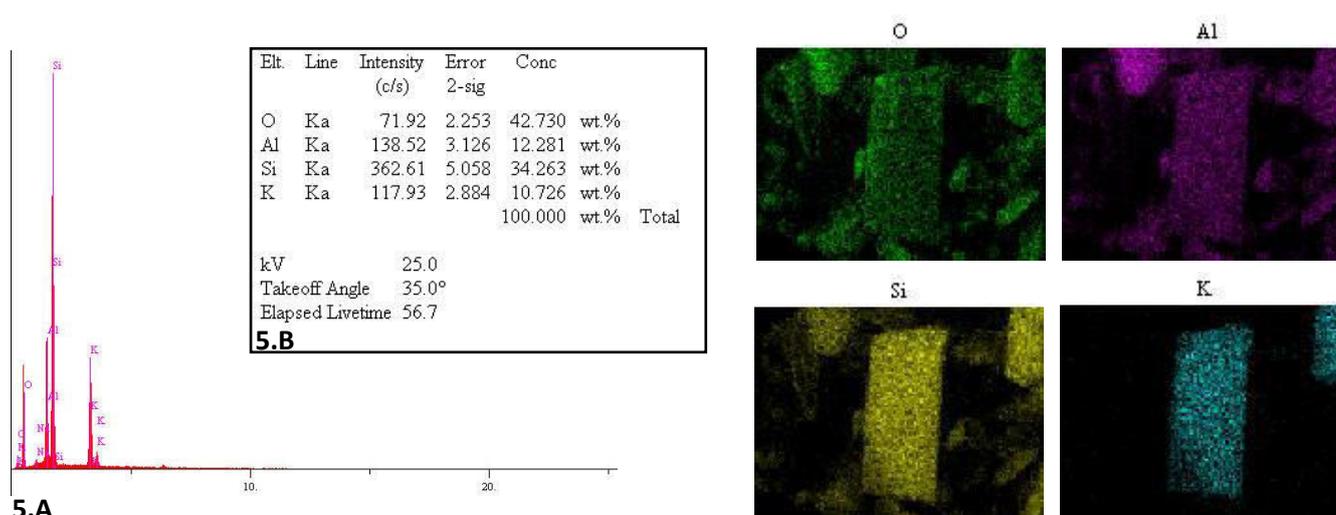
Microscópios Eletrônicos de Varredura equipados com Espectrômetro de Raios-X por energia dispersiva de elétrons (SEM/EDS) têm se tornado equipamentos comuns em laboratórios de pesquisa em geoquímica ambiental por razões muito simples: a produção de imagens que permitem caracterizar morfologicamente os espécimes, particularmente os sedimentos (Figura 4), e a geração de espectros de Raios-X que permitem qualificar e quantificar os

elementos químicos presentes nos espécimes; em ambos os casos em escala nanométrica. Indubitavelmente, a rapidez na obtenção de resultados, devido a sistemas computacionais acoplados aos equipamentos, associada à mínima necessidade de preparação dos sedimentos para análise em SEM/EDS são fatores favoráveis à escolha da metodologia (Figura 5).

Trafegamos, até o momento, em um mundo ideal, em que os dados apresentados sobre os sedimentos não geram dúvidas ou dificuldades de interpretação. Infelizmente, em relação a diversos elementos químicos há sobreposição de picos nos espectros de Raios-X; e, ainda, há a dificuldade de detectar elementos leves – Be, B, C, N, F, principalmente nos equipamentos convencionais que possuem janela de berílio nos detectores de Raios-X.<sup>5,6</sup> A detecção de berílio é praticamente inviabilizada nestes equipamentos. A detecção de carbono é dependente de sua concentração na amostra; e, a metodologia usual de imobilizar o material particulado para análise por SEM/EDS, com fitas adesivas de carbono, gera um ruído desta base que, na prática, inviabiliza a resolução em mapas de distribuição deste elemento.



**Figura 4.** Sedimentos recentes do estuário do Rio Paraíba do Sul. A morfologia (4.A) e a morfometria (4.B) de partículas e agregados é revelada por Microscopia Eletrônica de Varredura. As dimensões dos espécimes são obtidas através de softwares nativos dos equipamentos; permitindo, por exemplo, gerar dados sobre a distribuição do material particulado em função da dimensão de seu maior eixo (4.C). O tempo total para obtenção dos dados das figuras 4.A e 4.B é de aproximadamente 12 minutos

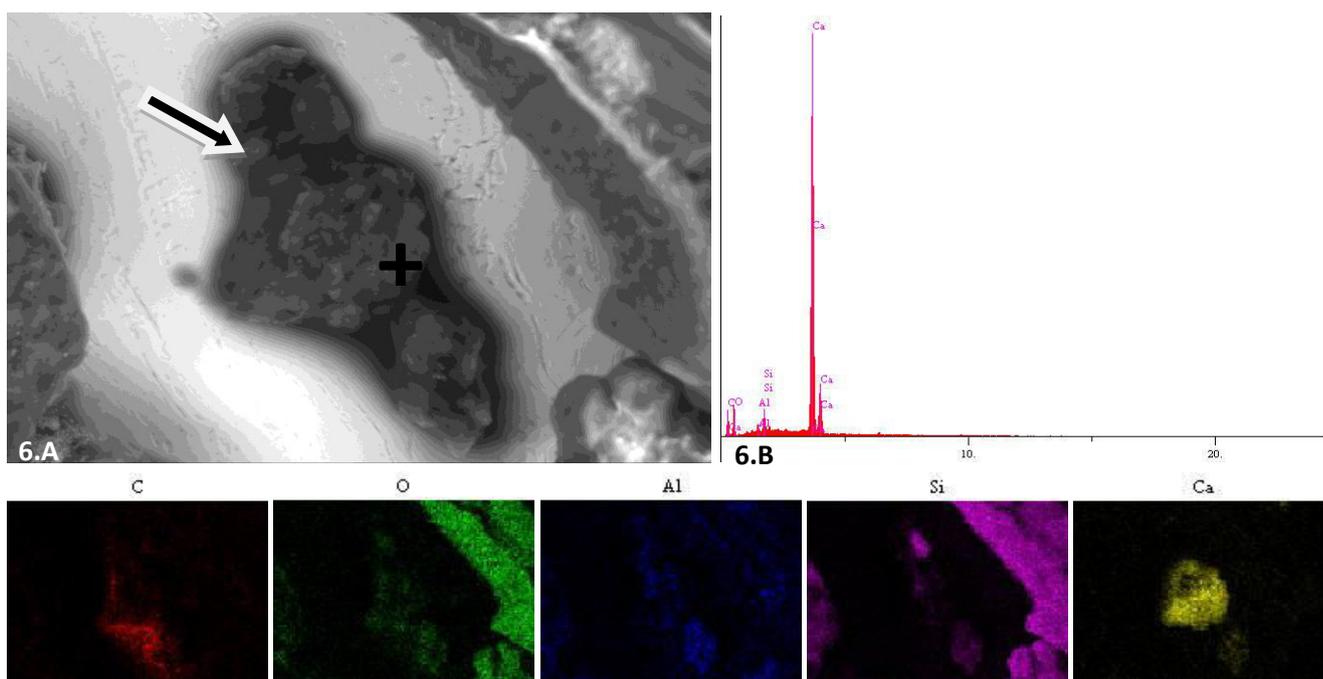


**Figura 5.** Dados qualitativos (5.A) e semiquantitativos (5.B) dos elementos químicos presentes na amostra na área analisada obtidos por SEM/EDS. Os mapas de distribuição de oxigênio, alumínio, silício e potássio, devido à clara sobreposição destes, permitem inferir a presença de aluminossilicato de potássio. O tempo total para obtenção dos dados da figura 5 é de aproximadamente 30 minutos

#### 4. Carbonato de cálcio em sedimentos por SEM/EDS

No universo dos elementos leves, o carbono é um elemento químico chave considerando-se que o dióxido de carbono é um dos gases que tem aumentado sua concentração na atmosfera e tem sido diretamente relacionado com o efeito estufa. O interesse na formação e dissolução de carbonato de cálcio é devido ao importante papel destas reações nos oceanos e ambientes aquáticos, em resposta ao aumento da pressão parcial de dióxido de carbono na atmosfera.<sup>7,8</sup> Por outro lado, calcita é constituinte comum de rochas sedimentares e *limestones* (calcáreo), formado preponderantemente de conchas de organismos marinhos. Do ponto de vista da geoquímica, a mineralogia de carbonatos pode fornecer importantes informações sobre a natureza dos processos sedimentares.

A dificuldade em detectar carbonatos, preponderantemente de cálcio, por SEM/EDS, nos levou a desenvolver recentemente uma metodologia nova e simples, na qual a detecção de dois elementos químicos – carbono e alumínio - chave na análise de sedimentos por SEM/EDS.<sup>9</sup> Convencionalmente, utilizam-se suportes de alumínio, sobre os quais se assentam fragmentos de fita de carbono dupla-face, sobre as quais os sedimentos liofilizados são então aderidos. A detecção apurada dos sinais de carbono e alumínio oriundos do material analisado é deteriorada pelo ruído destes elementos gerado por superfícies extra-amostra. Assim, demonstramos que a substituição da fita adesiva de carbono por um filme fino de éster de cianoacrilato (*Loctite Super Bonder*<sup>®</sup>) e o suporte de alumínio por um de ouro, por ser um metal raro na natureza, permite a detecção acurada de carbonatos e alumínio em sedimentos por SEM/EDS (Figura 6).



**Figura 6.** Sedimentos do Rio Jaguaribe, Ceará, Brasil, coletados a profundidade de 30 centímetros do leito do rio. Imagem de elétrons secundários de agregado sobre suporte de ouro (seta) por SEM (6.A). Espectro de Raios-X pontual (+) revelando carbono, oxigênio, alumínio, silício e cálcio (6.B). Os mapas de distribuição destes elementos químicos sugerem, devido à sobreposição de imagens, que o agregado é constituído majoritariamente por carbonato de cálcio e aluminossilicato de cálcio. A ausência de detecção do suporte de ouro deve-se ao volume do agregado

## 5. Perspectivas da Microscopia Analítica no contexto da Transferência de Materiais na Interface Continente-Oceano

O diferencial metodológico da microscopia analítica é associar a resolução espacial com a análise química, obtidas por espectrometria de Raios-X.<sup>2,3,4</sup> Em outras palavras, permite determinar a composição química de amostras biológicas e abióticas. As perspectivas de contribuição da microscopia analítica na compreensão da transferência de materiais na interface continente-oceano são caracterizar morfo-quimicamente partículas e agregados, bem como, qualificar e quantificar poluentes, com ênfase em metais e seus compostos, presentes em grãos dos sedimentos.

Materiais transferidos para o oceano são continuamente transportados na coluna d'água até que mecanismos de coagulação, floculação, precipitação e de simples deposição por gravidade ocasionam a formação dos sedimentos. Por ser uma metodologia que preserva os sinais e determina indicadores dos processos primários da sedimentação, a microscopia analítica, embora para elementos traço e ultra-traço apresente limitações de suas detecções, é ferramenta indiscutível na avaliação de sedimentos marinhos e estuarinos consolidados ou não conforme os exemplos apresentados neste artigo.

Recentemente, na análise de metais tóxicos, tradicionalmente nominados metais pesados, tem se preconizado a microscopia analítica para detecção destes metais e seus compostos em seus processos de mobilização, bem como, a exposição de seres vivos e seus efeitos tóxicos.<sup>10</sup> No estudo dos processos de transferência de materiais na interface continente-oceano, a microscopia analítica surge como ferramenta capaz de qualificar e quantificar os elementos químicos oriundos do continente, presentes nos sedimentos, e em que formas químicas estes elementos estão sendo incorporados aos sedimentos, bem como, inferir suas fontes.

Mudanças relativas nos fluxos de componentes individuais em testemunhos sedimentares marinhos podem ainda fornecer evidências dos passos dominantes do transporte que podem estar relacionadas à história climática<sup>11</sup>. A microscopia analítica, por associar resolução espacial e qualificação química, poderá contribuir para redesenhar os conhecimentos sobre o fluxo de componentes individuais em testemunhos sedimentares marinhos.

## 6. Conclusões

Há diversas metodologias que apresentam sensibilidades (limites de detecção) melhores, em termos de concentração, que a Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada à Espectrometria de Raios-X por energia dispersiva de elétrons (SEM/EDS). No entanto, a agregação desta estratégia em análises de geoquímica ambiental revela-se única quando informa a localização de determinado elemento químico em uma partícula ou agregado com forma identificável e dimensões mensuráveis. Tais dados poderão contribuir para redesenhar o conhecimento sobre sedimentos de rios, estuários e marinhos.

### Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Champness, P. E. *Ann. Rev. Earth Planet. Sci.* **1977**, 25, 203. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Krinsley, D. H.; Pye K.; Boggs Jr., S.; Tovey, N. K.; *Backscattered Scanning Electron Microscopy and Image Analysis of Sediments and Sedimentary Rocks*, 1<sup>st</sup> ed., Cambridge Univ. Press: Cambridge, 1998.
- <sup>3</sup> Severin, K. P.; *Energy dispersive spectrometry of common rock forming mineral*, 1<sup>st</sup> ed., Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 2004.
- <sup>4</sup> Reed, S. J. B.; *Electron Microprobe Analysis and Scanning Electron Microscopy in Geology*, 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press: New York, 2005.
- <sup>5</sup> Goodhew, P. J.; Humphreys, J.; Beanland, R.; *Electron Microscopy and Analysis*, 3<sup>rd</sup> ed., Taylor & Francis: London, 2001.
- <sup>6</sup> Goldstein, J.; Newbury, D.; Joy, D.; Lyman, C.; Echlin, P.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J.; *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, 3<sup>rd</sup> ed., Springer Science + Business Media, Inc: New York, 2003.
- <sup>7</sup> Millero, F. J. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 308. [CrossRef]
- <sup>8</sup> Morse, J. W.; Arvidson, R. S.; Lüttge, A. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 342. [CrossRef]
- <sup>9</sup> Miguens, F. C.; Oliveira, M. L.; Marins, R. V.; Lacerda, L. D. J. *Electron Microsc.* **2010**, 59, 437. [CrossRef]
- <sup>10</sup> Nordberg, G. F.; Fowler B. A.; Nordberg, M.; Friberg, L.; *Handbook on the toxicology of metals*, 3a. ed., Academic Press (Elsevier): USA, 2007.
- <sup>11</sup> Sageman, B. B. Em *Treatise on Geochemistry*; Holland, H. D.; Turekian, K. K., eds.; Elsevier: Estados Unidos, 2005, cap. 7.