

## **La Microscopía Electrónica de Barrido: una ventana al mundo micro.**

*Dra. Martina Avalos. Instituto de Física Rosario (IFIR-CONICET). Universidad Nacional de Rosario (UNR). Rosario, Santa Fe. Argentina.*

*avalos@ifir-conicet.gov.ar*

Alrededor de los 80 a.d.C. el médico de origen griego Asclepiades de Bitinia se declara en desacuerdo con la teoría de los humores de Hipócrates y desafiando los convencionalismos de su tiempo enuncia la primera teoría microbiana de la que se tienen registro al afirmar que las enfermedades eran causadas por partículas invisibles. Demás está decirlo: la mayoría pensó que se había vuelto loco...

La posibilidad de "ver" ha sido desde siempre uno de los motores de la ciencia. Si hoy admiramos la lucidez de Asclepiades es porque hemos visto estos microorganismos detrás del ocular maravilloso de un microscopio. Estos instrumentos abrieron las puertas al mundo de lo microscópico, y siguen hoy asombrándonos con imágenes de la naturaleza en la que logran resolver dimensiones nanométricas utilizando electrones en lugar de los clásicos fotones del microscopio óptico. Es que el poder de resolución, o lo que es lo mismo la capacidad de distinguir dos puntos como diferentes, depende de varios parámetros entre ellos la longitud de onda de la fuente que usamos para iluminar el objeto. La luz blanca por ejemplo, está compuesta por longitudes de onda que van desde 460 nm para el violeta hasta 660 nm para el rojo. Si en cambio usamos electrones, las longitudes de onda cambian en cinco órdenes de magnitud con una longitud de onda de aproximadamente  $8,5 \times 10^{-3}$  nm para un potencial de aceleración de 20 kV. Además de la mejora en resolución, el uso de electrones permite obtener imágenes con gran profundidad de campo en cualquier magnificación, lo que constituye también una ventaja frente a la microscopía óptica. Las figuras 1 y 2 corresponden a imágenes obtenidas en un microscopio electrónico de barrido FEG-SEM Quanta 200 y constituyen un claro ejemplo de gran poder de resolución en el caso de la figura 1, y de la profundidad de campo en el caso de la figura 2.

Los primeros trabajos que describen conceptualmente un microscopio electrónico de barrido o MEB datan de 1935. Sin embargo su desarrollo comercial ocurre en la década del 60. En estos microscopios las muestras debían ser cuidadosamente tratadas para resistir las altas energías de impacto de los electrones y el vacío de la cámara que aloja los especímenes. Es que en estos equipos los electrones deben viajar sin perder su energía desde el emisor donde son generados hasta la muestra por lo que debe extraerse gran parte del aire de la cámara para minimizar colisiones. En los años 80 la tecnología permitió el desarrollo de microscopios electrónicos de barrido que trabajan con bajo vacío y en modo ambiental facilitando así la observación de muestras cada vez con menos requerimientos de preparación pero a su vez con menor resolución.

La formación de una imagen de morfología o composición en un MEB depende de la recolección de diferentes señales que son re-emitidas como consecuencia de la interacción del haz de alta energía con la muestra. En estos equipos los electrones acelerados son generados por un emisor y conducidos, colimados y enfocados a lo largo de una columna al final de la cual se coloca el espécimen a observar. Cuando estos electrones acelerados ingresan a la muestra interactúan con ella, produciendo colisiones elásticas e inelásticas con los electrones y núcleos de los átomos. Como producto de estas interacciones se generan diferentes señales que son colectadas por detectores, decodificadas por la electrónica y analizadas por el software para poder construir por ejemplo imágenes y espectros de composición, para mencionar las aplicaciones más difundidas.

Los electrones retrodifundidos o electrones de alta energía y los secundarios de baja energía son las dos señales principales utilizadas para formar imágenes. Las figuras 1 y 2 por ejemplo fueron obtenidas a partir de la señal producida por electrones secundarios, que por su naturaleza son muy sensibles a la topografía de la muestra y adecuados para imágenes de gran detalle. La figura 3 es una imagen construida a partir de la señal producida por electrones retrodifundidos. El coeficiente de emisión de los electrones retrodifundidos se incrementa con el número atómico por lo que las imágenes obtenidas contienen información química con poco detalle de superficie. Al comparar esta imagen con otra de la misma zona obtenida con electrones secundarios (fig. 4) es posible ver la diferencia: la muestra es un sustrato de acero con un recubrimiento delgado y el uso de electrones retrodifundidos ha permitido detectar claramente aquellas zonas donde la capa ha desaparecido.

El análisis de composición química en simultáneo con la construcción de imágenes es, sin duda, una fortaleza de esta técnica. Este análisis se hace a partir de la señal de rayos X emitidos cuando electrones de los orbitales atómicos de mayor energía cubren vacancias producidas por las colisiones de los electrones del haz primario con los electrones ubicados en orbitales de menor de energía. Estos fotones de rayos X son característicos de cada átomo y su análisis permite saber cuáles son los elementos químicos de la muestra cuando éstos están presentes en más de 200 ppm si son elementos puros y 1000 ppm en el

caso de compuestos. La figura 5 muestra un análisis típico en un conjunto de fibras de asbesto. La composición de la muestra en el lugar donde está la cruz es la que se indica a la derecha de la imagen.

La mayoría de las muestras biológicas destinadas al estudio por MEB son, en general, malas conductoras y compuestas por cantidades variables de agua y elementos sensibles al haz de electrones. Si se necesita una observación de baja resolución esto no es un problema ya que puede utilizarse un microscopio ambiental y electrones de baja energía. La figura 6 por ejemplo, corresponde a una imagen, tomada en modo ambiental, de fibras de tejido muscular infectadas con tripanozoma cruzi. Sin embargo cuando se necesitan imágenes con alta resolución se necesita recurrir a instrumentos que operen en alto vacío y atmósferas muy secas para poder producir y conducir electrones con alta energía.

El uso de un MEB requiere en primer lugar comprender los procesos básicos vinculados con la obtención de imágenes y composición química. En segundo lugar se requiere considerar cómo preparar las muestras de acuerdo al tipo de información que se necesita obtener. Y finalmente estar preparado para interpretar la información obtenida, relacionando de manera adecuada datos de forma y estructura obtenidos en dos dimensiones con la muestra real y evaluando la validez de los datos de composición química de una muestra tridimensional.

Existen dos criterios para trabajar en microscopía electrónica que permiten salvar las diferencias entre las propiedades de la muestra y las condiciones óptimas de operación en un MEB. Se pueden ajustar las condiciones de trabajo para que los procedimientos sean lo menos invasivos posibles o se puede modificar la muestra para hacerla más resistente a los efectos del haz de electrones de alta energía. Si bien ambos criterios implican siempre una aproximación al problema real, la preparación es un pre-requisito para observar una muestra e implica siempre dejar fuera una parte de la realidad.

Los aspectos fundamentales a considerar previo al diseño de cualquier protocolo de preparación de muestras son la estabilidad química y la resistencia al daño por radiación. Le siguen en orden de importancia la cantidad de agua y la capacidad de conducción. Es necesario establecer claramente las preguntas que queremos responder y porqué el microscopio electrónico resulta una herramienta útil en este contexto. Además es importante tener la mayor cantidad de información relativa a composición y estructura disponible por otras técnicas. El uso previo de microscopía óptica es aconsejable en la mayor parte de los casos. Si la muestra tiene varias fases se debe priorizar siempre los métodos de preparación que preserven esa fase. Por otra parte, antes de preparar una muestra es importante consultar sobre dimensiones de la cámara del microscopio a utilizar con el servicio de microscopía con el cual se va a trabajar ya que esto condiciona el tamaño y la forma de la muestra a observar y el tipo de soporte más adecuado para las posibilidades de trabajo del equipo.

Existe gran cantidad de información oral y escrita sobre preparación de muestras para microscopía electrónica. La experiencia de otros es fundamental en este campo de trabajo que tiene tanto de ciencia como de arte. Los puntos a tener en cuenta son básicamente aquellos vinculados con

- la deshidratación y secado de muestras
- la estabilización frente a los efectos del haz de electrones
- la preservación de su identidad química y estructura,
- el mantener la muestra limpia y libre de aquellos materiales que oscurecen la superficie a observar o enmascaran su condición química,
- que la muestra sea conductora o no acumule carga dentro de la columna del microscopio
- reconocer defectos y daño originados en la muestra durante su preparación.
- considerar formas de almacenamiento de las muestras que preserven sus características si no se pueden ver en el microscopio inmediatamente después de prepararlas

Finalmente solo resta prepararse para vivir una experiencia única como lo es el espiar el mundo de lo microscópico. Pero eso es otra historia.



Figura 1. Imagen de un alacrán. En la misma puede apreciarse la profundidad de campo y el grado de detalle de una imagen obtenida con electrones.\*

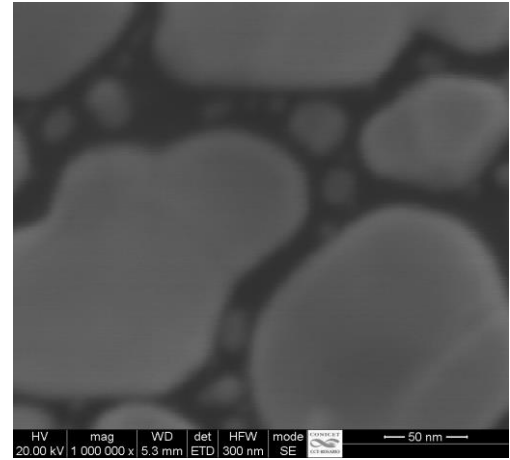


Figura 2. Partículas de oro depositadas sobre una lámina de carbono. Se observan claramente espacios entre partículas de alrededor de 7 nanómetros.\*

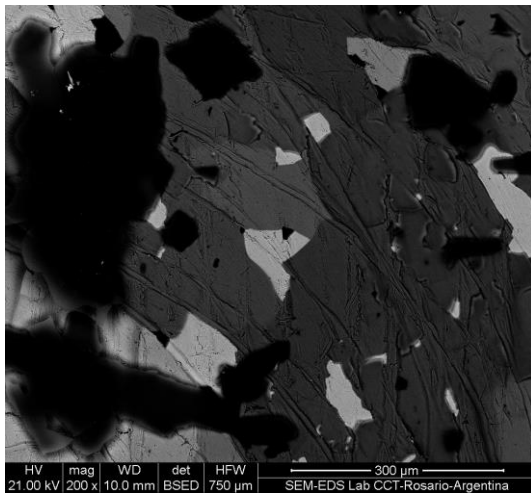


Figura 3. Imagen de un sustrato de acero con un recubrimiento delgado obtenida con electrones retrodifundidos. El uso de esta señal ha permitido detectar claramente zonas donde el recubrimiento ha desaparecido (muy claras) y zonas de depósito en exceso (muy oscuras).\*

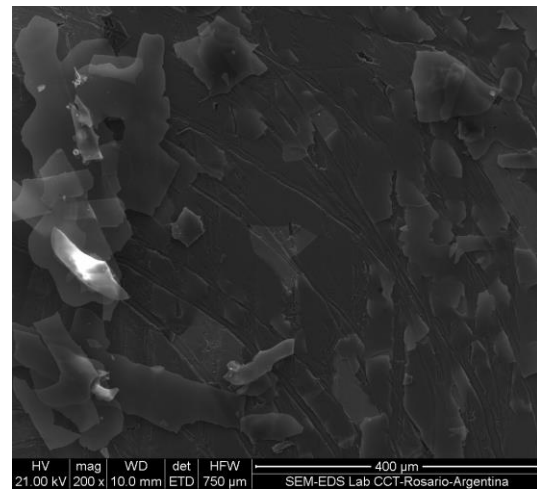


Figura 4. Esta imagen corresponde a la misma zona de muestra observada en la figura 3 pero construida a partir de la señal de electrones secundarios.\*

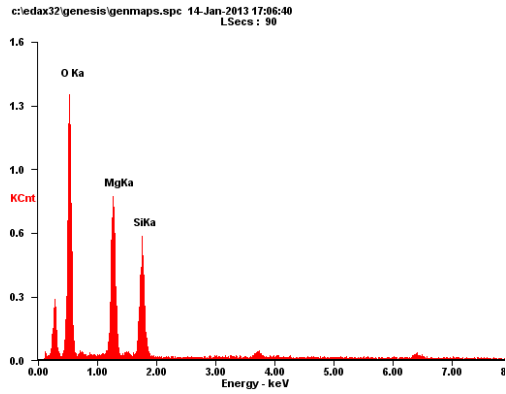
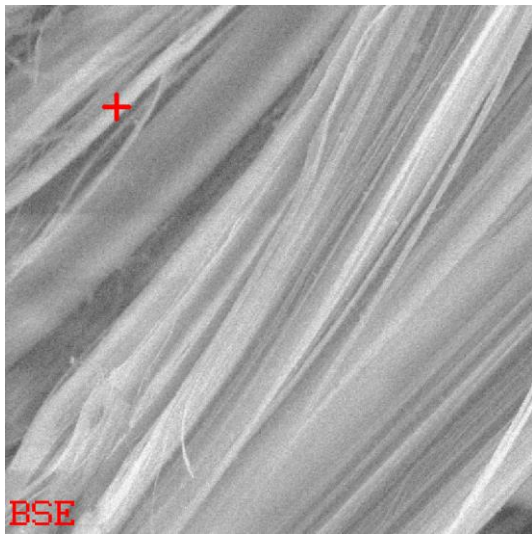


Figura 5. Conjunto de fibras de asbesto con un análisis de composición de la zona indicada con la cruz. \*

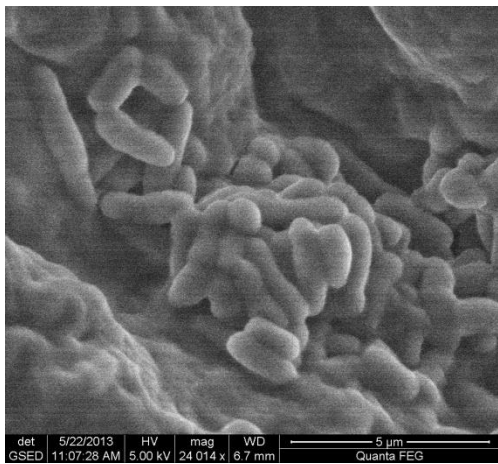


Figura 6. Imagen de tripanozoma crucei en tejido muscular obtenida en modo ambiental. Para su observación en este modo la muestra fue preparada solo incluyendo fijación con glutaldehído. \*

*\*Todas las imágenes de este artículo fueron tomadas en el laboratorio de microscopía electrónica del CCT Rosario. Gentileza Vanina Tartalini, Pablo Díaz y Pablo Risso*