

## Sesión Teórico-Práctica 4 Fundamentos de microscopía electrónica<sup>1</sup>

### PARTE TEÓRICA<sup>2</sup>

- 4.1. Fundamentos técnicos de la microscopía electrónica.
- 4.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) vs microscopía electrónica de transmisión (TEM)
- 4.3. Otros tipos de microscopía electrónica.
- 4.4. La microscopía electrónica y las ciencias forenses.

### Fundamentos técnicos de la microscopía electrónica

La microscopía electrónica ha revolucionado el conocimiento de ciencias como la biología o la medicina, aunque su campo de aplicación se ha extendido a la mayoría de disciplinas científicas, incluidas las de materiales. La principal ventaja de este tipo de microscopía es alcanzar una extraordinaria amplificación de la imagen de la muestra manteniendo un poder de resolución casi mil veces mayor que el óptico. Estas magníficas propiedades se deben a que la fuente de iluminación usada es un haz de electrones. El funcionamiento de la microscopía electrónica, sobre todo la de transmisión, es análogo al funcionamiento de un microscopio óptico. Por tanto una vez entendido los fundamentos técnicos de la microscopía óptica serán también fáciles de entender los de la microscopía electrónica y, para su descripción, nos vamos a basar inicialmente en el microscopio electrónico de transmisión.

**Imagen:** En el caso del microscopio electrónico la formación de la imagen se produce por la dispersión de los electrones, mientras que en el óptico la imagen se produce por absorción de los fotones. Es decir la imagen que se observa en un microscopio óptico (MO) se debe a la diferente absorción de la luz por las distintas estructuras de la muestra, mientras que en el microscopio electrónico la formación de la imagen está en función de la dispersión y, por consiguiente, pérdida de los electrones (figura 1). Esta capacidad de dispersión va a depender de las distintas estructuras atómicas de la muestra.

---

<sup>1</sup> Este documento está sujeto a una licencia Creative Commons



<sup>2</sup> La procedencia y autoría de las imágenes y esquemas utilizados se encuentra al final del texto

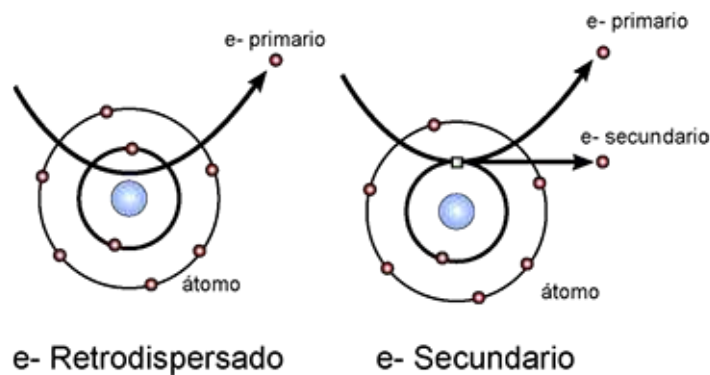


Figura 1. Efectos básicos de los electrones al chocar con la materia. El electrón retrodispersado es aquel que cambia su trayectoria al atravesar un átomo, mientras que el electrón secundario es aquel que surge del átomo al colisionar con él un electrón primario, que a su vez es retrodispersado. Estos fenómenos explican la imagen que se produce principalmente en un microscopio electrónico de transmisión y en uno de barrido.

**Aumentos:** las lentes del microscopio electrónico son electromagnéticas y actúan como las de un óptico (lamina 1A), es decir, desviando la trayectorias seguidas por los electrones en el vacío. En microscopía óptica los vidrios de superficies curvas (lentes) pueden desviar el haz luminoso haciendo que la imagen de un objeto parezca más grande, en microscopía electrónica este mismo efecto se consigue con campos magnéticos. Los aumentos en este tipo de lentes se obtienen modificando la intensidad de la corriente que se hace pasar por las bobinas que conforman las lentes, provocando un aumento del campo de fuerza y, por tanto, un desvío mayor o menor del haz de electrones. Mientras las lentes de un MO tienen una distancia focal fija, las lentes electromagnéticas del ME tienen una distancia focal variable, por lo que para incrementar los aumentos no es necesario cambiar de lente sino simplemente aumentar el campo de fuerza de la lente electromagnética. Las lentes electromagnéticas producen desviaciones no proporcionales del haz de electrones que se manifiesta como una aberración denominada astigmatismo, pero que se pueden corregir mecánicamente.

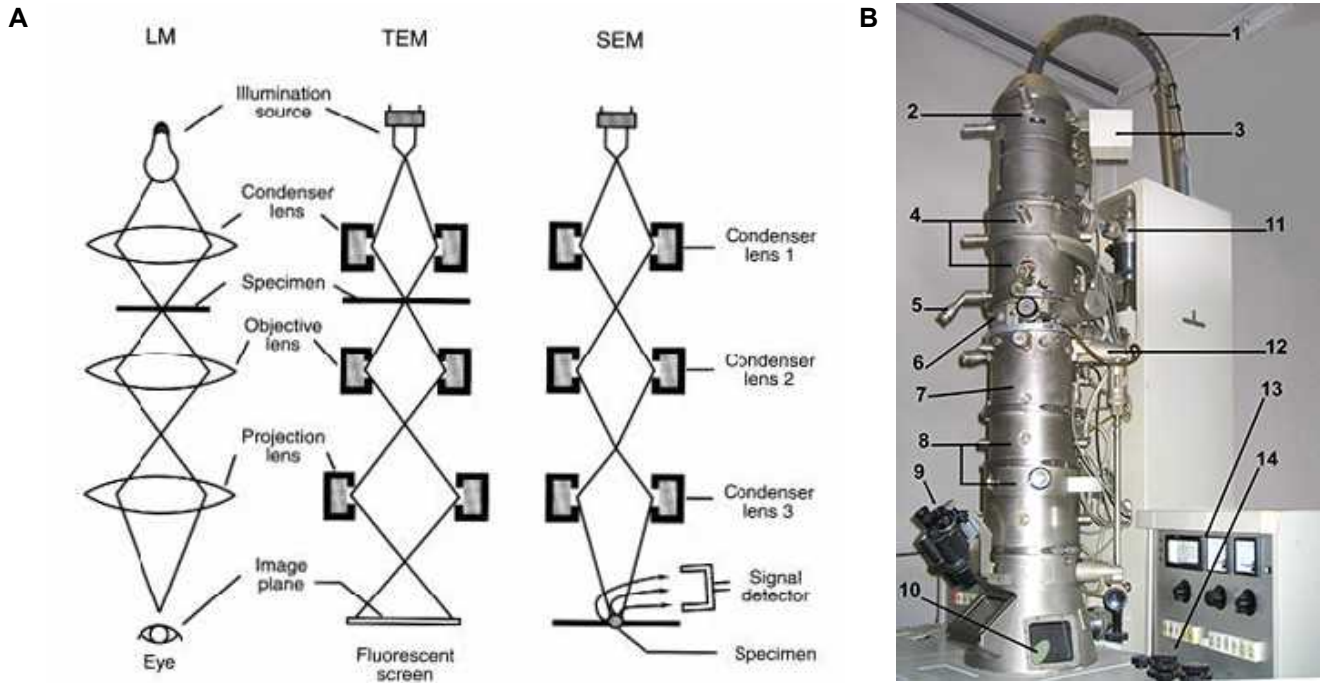


Lámina 1. Microscopio electrónico de transmisión. A.- Esquema comparado de un microscopio óptico, un electrónico de transmisión (TEM) y uno de barrido (SEM), como se puede observar la estructura del SEM es un poco diferente. B.- Partes de un TEM del año 1969: (1) cable de alta tensión, (2) emisor de electrones, (3) motor para centrar el haz del emisor de electrones, (4) condensador, (5) control de apertura del diafragma, (6) portamuestras, (7) objetivo (lente condensador), (8) proyector (lente condensador), (9) binocular óptico de observación, (10) pantalla fluorescente, (11) bomba de vacío, (12) goniómetro, (13) control de vacío y de aumentos, (14) control de enfoque. C.- Aspecto de un TEM actual con sistema de captura de imágenes

**Iluminación:** El haz de electrones se obtiene por la excitación de un filamento metálico (cátodo) y es atraído por la diferencia de potencial producida en el ánodo (50.000-100.000 voltios). Este fenómeno se produce cuando cátodo y ánodo se encuentra en vacío (lamina 1B). Como el haz de electrones es divergente, se usa una lente

condensadora para dirigir el haz hacia la muestra, que debe ser un corte muy fino y preparado de manera especial. Los electrones que no son totalmente dispersados son reconducidos por la lente objetivo produciéndose el aumento de la imagen que es proyectada por la lente objetivo o proyector. Como los electrones no son visibles estos se observan en una pantalla o en un negativo impresionado (lamina 1B y C). Las partes de la imagen donde los electrones han sido muy desviados no resultan muy intensas, dando una tonalidad clara en el negativo, que se rebelará oscuro cuando se positiva. Por tanto, aquellas áreas de la muestra que tienen un mayor índice de dispersión, son más densas a los electrones, aparecerán oscuras en la imagen final; justo al contrario que aquellas áreas donde no exista prácticamente dispersión. El contraste se puede mejorar con un pequeño diafragma que limita solamente a los electrones más periféricos. La profundidad de campo es más o menos constante, dada las peculiaridades técnicas del microscopio, pero ésta (aproximadamente  $1\mu\text{m}$ ) es suficiente para que esté enfocada toda el grosor de la muestra, que es inferior a  $0,5\mu\text{m}$ .

***Poder de resolución:*** en la microscopía óptica el poder de resolución está limitado por la longitud de onda de los fotones, pero en el microscopio electrónico se juega con la ventaja de una pequeñísima longitud de onda en la propagación de los electrones, por lo que el poder de resolución es muy elevado. Esto permite, que imagen pueda ser aumentada posteriormente en una copia fotográfica muchas veces, para observar todos los detalles. El poder de resolución de esta microscopía es de 5 a  $10 \text{ \AA}$  ( $0,5$  milimicras) (lámina 2).

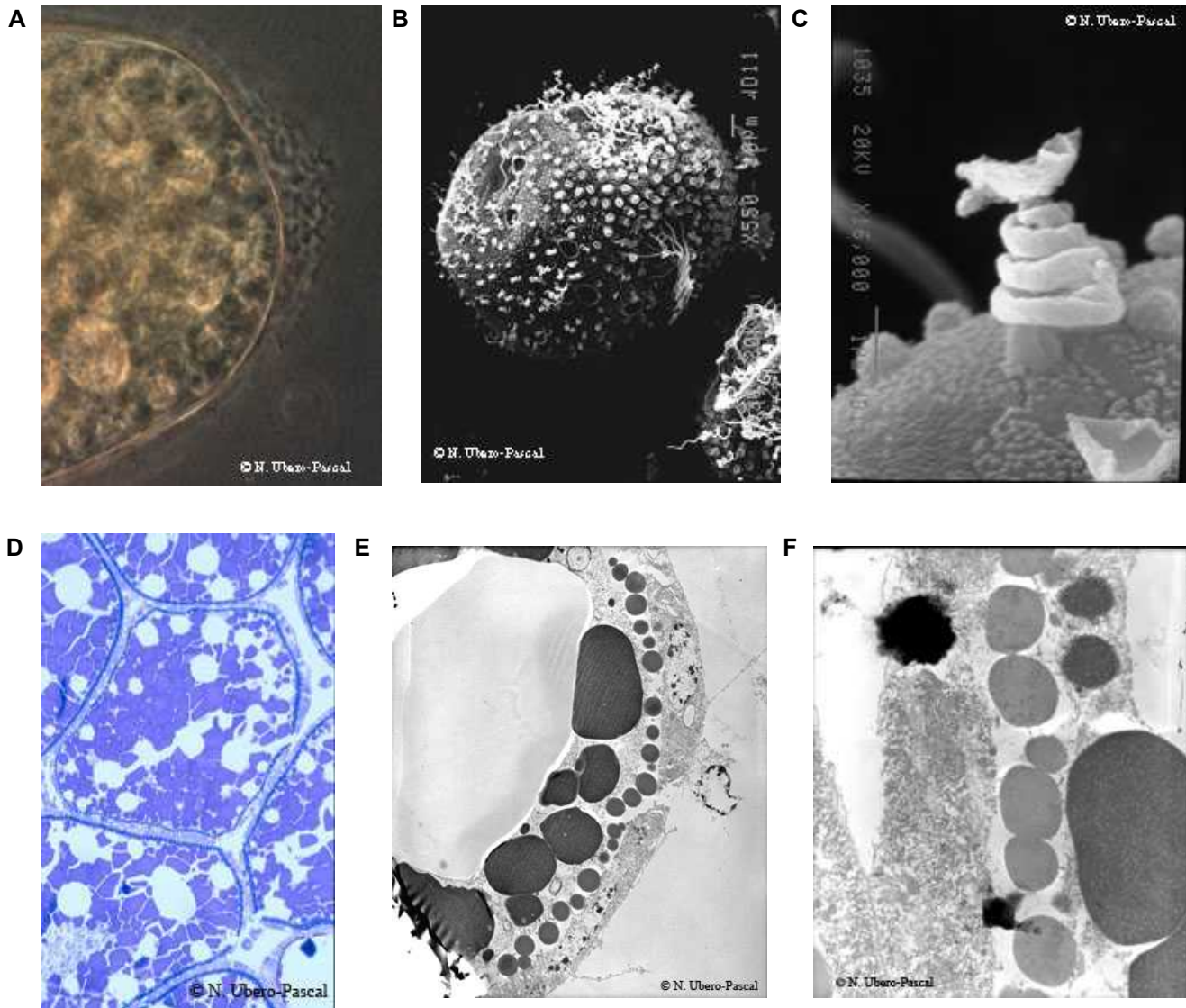


Lámina 2. Ejemplos de microscopía óptica comparada con electrónica de barrido y de transmisión usando huevos de un efemeróptero. A.- Preparación "in toto" observada a 100 aumentos con contraste de fases en un microscopio óptico; B.- Huevo completo observado a 550 aumentos en un SEM; C.- Detalle estructura de fijación de huevo observada a 16.000 aumentos en un SEM; D.- Corte semifino de ovario teñido con azul de toluidina observada a 100x con microscopio óptico; E.- Corte ultrafino de ovario teñido con acetato de uranilo observada a 1000 aumentos con un TEM; F.- Corte ultrafino de ovario teñido con acetato de uranilo observado a 10.000 aumentos con un TEM

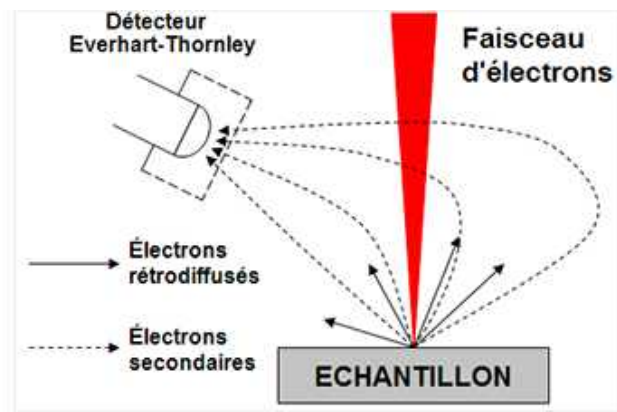
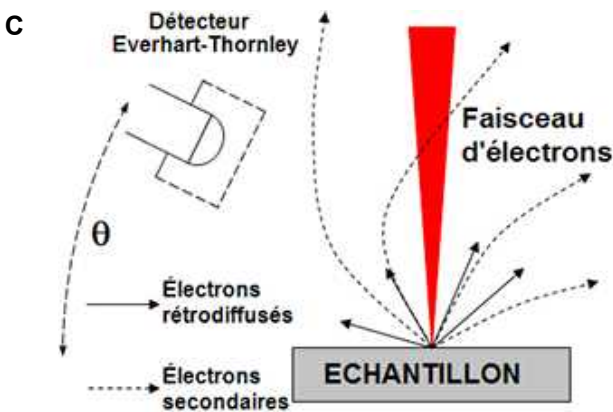
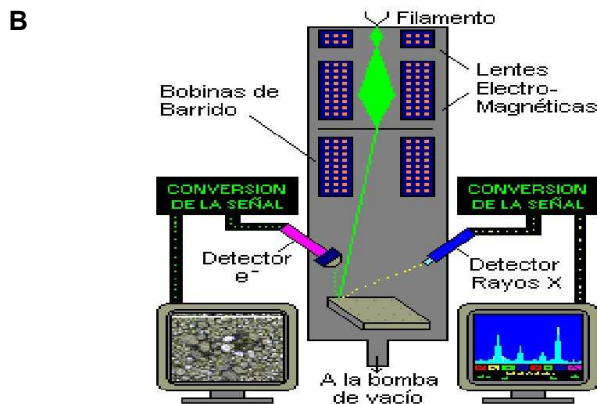
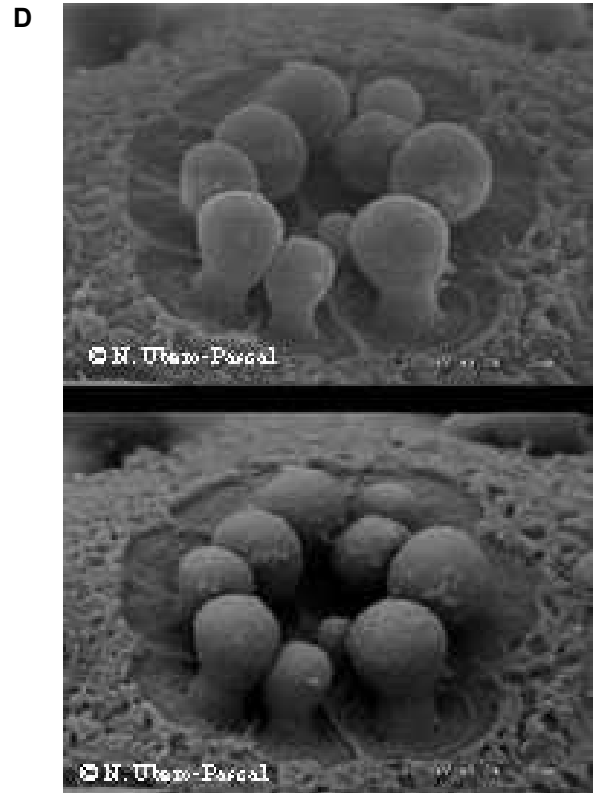


## **Microscopía electrónica de barrido (SEM) vs microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado (lámina 2A). A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales con los que trabajan los investigadores de la comunidad científica y las empresas privadas, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales utilidades del SEM son la alta resolución ( $\sim 100\text{\AA}$ ), la gran profundidad de campo que resuelve una imagen tridimensional de la muestra y la relativa sencillez de preparación de las muestras.

El microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores (lámina 2 B y C), entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución (SEI), un detector de electrones retrodispersado que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie (BEI) y un detector de energía dispersiva (EDS) que permite detectar los rayos X generados por la muestra y realizar análisis de distribución de elementos en superficie.

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) tiene un modo de operar similar al del microscopio óptico, ya que está basado en el hecho de que la manera de actuar un campo electromagnético sobre un haz de electrones es análogo a la acción de una lente de cristal sobre el haz de fotones. La imagen, sin embargo, se forma sobre una pantalla fluorescente como lo haría en una pantalla de televisor. El microscopio electrónico de barrido no tiene la resolución que se alcanza con el microscopio electrónico de transmisión, pero su ventaja es una excelente impresión tridimensional, derivada de la amplificación de señales que se generan al irradiar la superficie de las muestras con un haz muy estrecho de electrones.



Lamina 3. Microscopio Electrónico de Barrido. A.- Aspecto externo de un SEM moderno; B.- Esquema general de un SEM indicando el detector de electrones secundarios (SEI) y la sonda de rayos X; C.- Esquema de la detección de los electrones secundarios mediante el detector de la izquierda el detector no tiene polaridad y son captados los electrones retrodispersados mediante un detector BEI, mientras que el de la derecha sí, atrayendo así los electrones secundarios al detector SEI. D.- Ejemplo de imágenes de la misma estructura obtenidos mediante un detector SEI y un detector BEI.

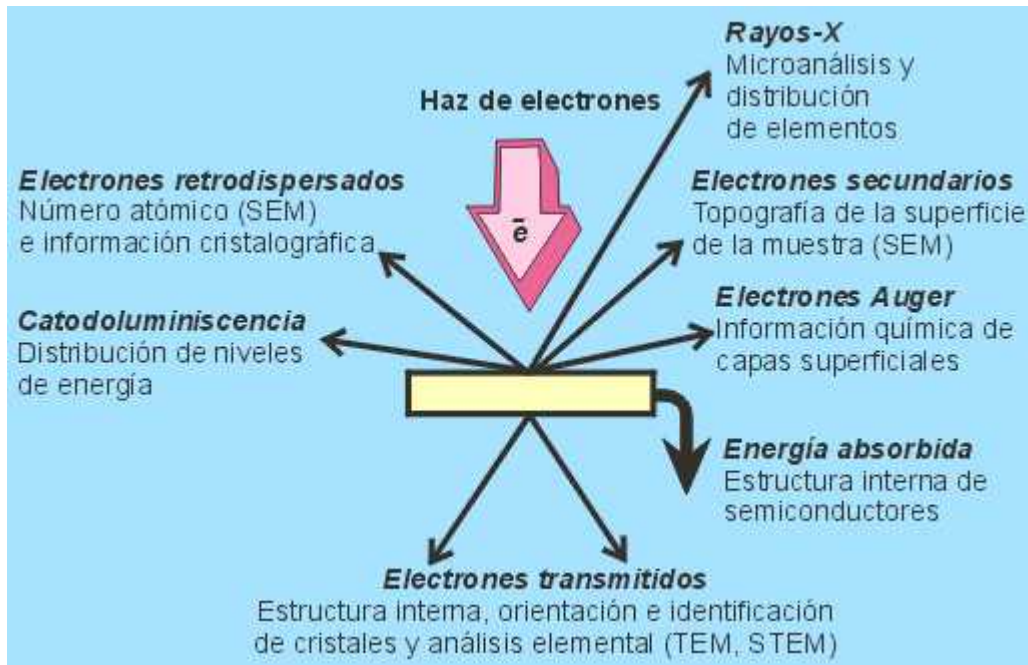


Figura 2. Esquema general del efecto del haz de electrones sobre una muestra que dan lugar a los tipos de microscopía electrónica más importantes, así como las posibilidades técnicas de cada una

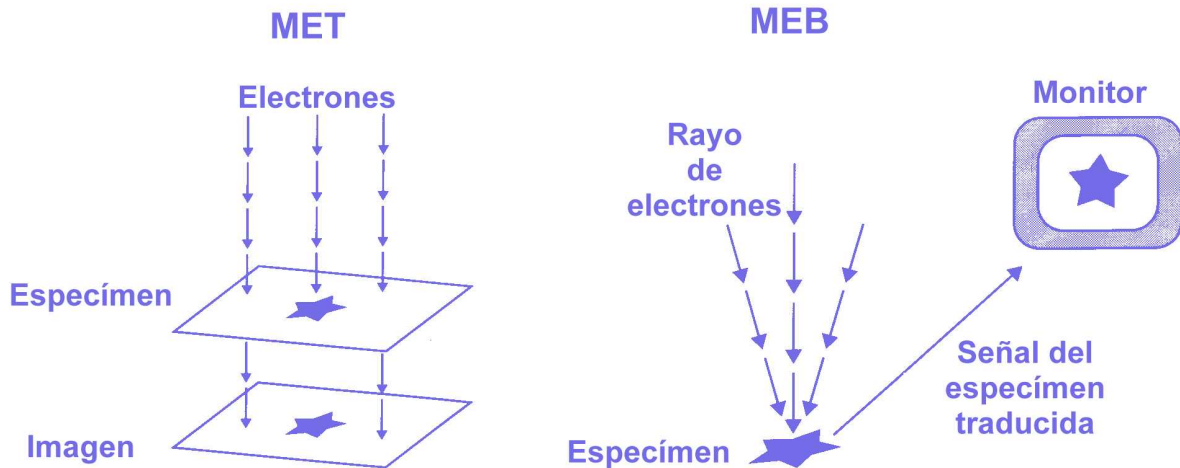


Figura 3. Esquema básico de la obtención de la imagen en un TEM y un SEM



## Otros tipos de microscopía electrónica

*Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM)* de última generación que admite el análisis de muestras en estado natural o bajo condiciones ambientales naturales, sin necesidad de usar técnicas convencionales de preparación de muestras. Además, es posible utilizar régimen de alto vacío de forma similar a los microscopios SEM convencionales.

*Microscopio Electrónico de Barrido de Congelación (Cryo-SEM)*: Es un tipo de microscopio electrónico que basa su funcionamiento sobre muestras congeladas. La congelación de la muestra se realiza una vez puesta sobre el pedestal introduciéndola en nitrógeno líquido. El pedestal se acopla a una varilla que es introducida en un compartimento cilíndrico con nitrógeno líquido, estructura que se acopla a una la unidad de alto vacío del SEM que mantiene la congelación. Esta crio-cámara presenta una serie de utensilios para manejar la muestra congelada (por ejemplo para fracturarla) y en ella se lleva a cabo la sublimación de la muestra y su cubrimiento metálico (método de sputtering). Una vez metalizada la muestra se introduce en la cámara de alto vacío de observación, mediante un sistema mecánico interno, pudiendo analizar la muestra como un SEM normal.

*Microscopio Electrónico de Barrido para Transmisión (STEM)*: Es un tipo de microscopio electrónico de transmisión que permite capturar los electrones que atraviesan la muestras como ocurre en un TEM normalmente, pero tiene asociado un detector de electrones secundarios (aquellos que se desprenden de la muestra cuando el choca con ella: fundamento técnico del SEM) permitiendo obtener una imagen de barrido de un punto de terminado de la muestra. Obviamente, las muestras dirigidas a este tipo de microscopio deben ser láminas finas, con el fin de que los electrones puedan atravesarla. En realidad, la utilización más cercana con el SEM es que lleva asociado una sonda de rayos X, lo que permite analizar químicamente puntos determinados de la muestra.



Lámina 4. A.- Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM); B.- Microscopio electrónico de Barrido que puede trabajar sin metalización previa de las muestras; C.- Microscopio Electrónico de Barrido para Transmisión (STEM); D.- Microscopio Electrónico de Barrido preparado para analizar muestras congeladas (Crio-SEM); E.- Detalle de la crio-cámara adosada a la cámara de visualización propia del SEM.

## La microscopía electrónica y las ciencias forenses

Las aplicaciones de la microscopía electrónica son muy variadas y van desde la industria petroquímica o la metalúrgica hasta las ciencias experimentales y de la salud. En ciencias forenses, el microscopio electrónico de barrido tiene una mayor utilidad, ya que al proporcionar datos morfológicos de gran precisión (tamaño, textura, forma de la muestra, composición química elemental), permite el estudio de muestras de cualquier tipo y origen. Entre los campos científicos con interés forense en los que se aplica el SEM podemos mencionar:

- Geología: estudio morfológico y estructural de muestras cristalográficas, mineralógicas y petrológicas.
- Estudios de los materiales: caracterización microestructural, valoración de su deterioro, presencia de defectos, tipo de degradación (fatiga, corrosión, fragilidad, etc.) de materiales cerámicos, metálicos, semiconductores, polímeros.
- Control de calidad: productos manufacturados de origen animal o vegetal (pieles, fibras), microelectrónica y materiales informáticos, etc.
- Estudio de muestra botánicas, zoológicas, médicas, biomédicas, etc.
- Peritaciones caligráficas

## Fuentes de Información

1. González, R. 1966. *Manual de microscopía electrónica*. Monografías de Ciencia Moderna. CSIC.
2. Aballe, M., J. López Ruiz, J.M. Badía y P. Adeva (coordinadores). 1996. *Microscopía electrónica de barrido y microanálisis de rayos X*. CSIC, Ed. Rueda.
3. Goldstein, J.I., D.E. Newbury, P. Echlin, D.C. Joy, A.D. Romig, Jr., C.E. Lyman, C. Fiori and E. Lifshin. 1992. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: a text for biologist, materials scientists, and geologist*. 2nd. Ed. Springer Science. New York.
4. [Virtual Microscopy. Imaging Technology Group. Beckman Institute for Advance Science and Technology. University of Illinois](#)
5. [Central Microscopy of The University of Iowa](#)
6. [Material Science and Engineering Department. Iowa State University](#)
7. [Scanning Electron Microscopy. Museum of Science. Boston](#)
8. [Métodos de Análisis Microscópico. Departamento de Ciencias Analíticas. Universidad Nacional de Educación a Distancia](#)
9. [Electron Microscopy. Swiss Federal Institute of Technology of Zurich](#)

10. [The Unit for Nanocharacterization of The Hebrew University of Jerusalem](#)
11. Virtual Classroom Biology de la [Faculty of Science, Mathematics and Computing Science](#) de la [Radboud University Nijmegen](#)

## Créditos de las figuras

- El logo del encabezamiento proceden de la página web <http://ocw.um.es/>
- La figura 1 ha sido adaptada de las imágenes de Dake y han sido obtenidas de la página [Wikimedia Commons](#). La imagen se encuentra en la dirección: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sem\\_electrons\\_photons.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sem_electrons_photons.svg).
- La figura A de la lámina 1 han sido obtenidas de la página web de [Central Microscopy](#) de la Universidad of Iowa. Las fotografías se encuentran en la dirección: <http://www.uiowa.edu/~cemrf/methodology/tem/index.htm>.
- Las figuras B y C de la lámina 1 son de Ricce y de "FEI" respectivamente y han sido obtenidas de la página [Wikimedia Commons](#). Las fotografías se encuentran en las direcciones: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simens\\_numeri.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simens_numeri.jpg) y <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FEITecnaispirit05.jpg>.
- Todas las imágenes de la lámina 2 son del autor del texto, Nicolás Ubero Pascal
- La figura A de la lámina 3 es de D. Schwen y han sido obtenidas de la página [Wikimedia Commons](#). La imagen se encuentra en la dirección: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Goe\\_SEM\\_students\\_working1.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Goe_SEM_students_working1.jpg).
- La figura B de la lámina 3 procede de la página web [Programa de Biología Celular](#) desarrollada por el Grupo de Neurobiología del Departamento de Nutrición y Bioquímica de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. La fotografía se encuentra en la dirección: <http://javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/microelectrans.htm>.
- La figura C de la lámina 3 ha sido adaptada de las imágenes de Steff obtenidas de la página [Wikimedia Commons](#). Las fotografías se encuentran en las direcciones: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:EVT%2B.PNG> y <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f1/EVT-.PNG>.
- La figura D de la lámina 3 es del autor del texto, Nicolás Ubero Pascal
- La figura 2 procede de la página web [Crista Mine](#) desarrollada por el Departamento de Ciencias Analíticas de la UNED y el Departamento de Ingeniería Geológica de la ETSI de Minas de Madrid (UPM). La fotografía se encuentra en la dirección: [http://www.uned.es/cristamine/mineral/metodos/micr\\_electr.htm#tipos](http://www.uned.es/cristamine/mineral/metodos/micr_electr.htm#tipos).
- La figura 3 procede de la página web [Programa de Biología Celular](#) desarrollada por el Grupo de Neurobiología del Departamento de Nutrición y Bioquímica de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. La fotografía se encuentra en la dirección: <http://javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/microelectrans.htm>.
- La figura A de la lámina 4 procede de la página web [The Unit for Nanocharacterization](#) de The Hebrew University of Jerusalem. La fotografía se encuentra en la dirección: [http://nanoscience.huji.ac.il/unc/esem\\_main.htm](http://nanoscience.huji.ac.il/unc/esem_main.htm)
- Las figuras B y C de la lámina 4 proceden de la página web Direct Industry. Las fotografías se encuentran en la dirección: [http://www.directindustry.es/prod/hitachi-high-technologies-europe-gmbh/microscopio-electronico-de-barrido-sem-30506-199337.html#prod\\_199337](http://www.directindustry.es/prod/hitachi-high-technologies-europe-gmbh/microscopio-electronico-de-barrido-sem-30506-199337.html#prod_199337)
- La figura D de la lámina 4 procede de la página web Quorun Technology. La imagen se encuentra en la dirección: [http://www.sputtercoating.com/Applications/Case\\_studies/Universidad-Politecnica-de-Cartagena.htm](http://www.sputtercoating.com/Applications/Case_studies/Universidad-Politecnica-de-Cartagena.htm)
- La figura E de la lámina 4 procede de la página web Virtual Classroom Biology de la [Faculty of Science, Mathematics and Computing Science](#) de la [Radboud University Nijmegen](#). La imagen se encuentra en la dirección: <http://www.vcbio.science.ru.nl/en/fesem/info/cryosem/>