

## *Preparación de muestras*

P. Adeva

### **18.1. Introducción**

La labor del microscopista es la de caracterizar una amplia variedad de tipos de muestras y por tanto, debe estar familiarizado con las diferentes técnicas de preparación de muestras.

Aunque por lo general cada Laboratorio de Microscopía Electrónica está especializado en una determinada disciplina, es conveniente que los técnicos tengan conocimientos básicos de las distintas técnicas de preparación. No es extraño que, por ejemplo, en un laboratorio de Ciencia de Materiales les sean requeridos sus servicios por parte de otros laboratorios incluso para estudiar muestras biológicas. Estos equipos son costosos y no todos los laboratorios o empresas pueden adquirirlos.

La tendencia, tanto en España como en otros muchos países, es la de crear Servicios Centrales de Microscopía Electrónica, por una parte, para evitar la infrautilización de equipos, y por otra, con objeto de cubrir las necesidades de diferentes equipos investigadores. Todo ello obliga al operador a familiarizarse con los diferentes métodos de preparación de muestras.

En este capítulo pretendemos dar unas ideas básicas sobre cómo han de prepararse las muestras para ser observadas y estudiadas en el MEB y MSA para obtener la máxima información.

#### *18.1.1. Consideraciones previas*

Antes de comenzar la preparación, el microscopista ha de examinar previamente la muestra visualmente o bien con un MO a bajos aumentos, con el fin de elegir la zona de estudio. Recordemos que el aumento de un MEB es generalmente como mínimo de  $\times 10$ , con lo cual será muy útil y ahorrará mucho tiempo tener perfectamente localizada la zona de estudio. Hay que insistir que el MEB no representa una alternativa al MO, sino que es una técnica complementaria. Ambos microscopios aportan diferentes tipos de información y revelan datos complementarios. Por ejemplo, una muestra pulida se debe observar en el MO antes de realizar un microanálisis, y las micrografías ópticas sirven de guía para la observación posterior al MEB.

Asimismo es necesario tener muy claro, antes de comenzar cualquier preparación, cuál es el estudio que se quiere realizar, sobre todo en el caso de trabajar con muestras no conductoras. Dependiendo del tipo de estudio que se pretenda llevar a cabo se elegirá el método de preparación más adecuado. Una preparación inapropiada conduce, en la mayoría de los casos, a resultados no sólo poco fiables, sino incluso completamente erróneos.

Antes de describir las diferentes técnicas de preparación de muestras, vamos a hacer unas consideraciones de tipo general tales como tamaño de muestra, montaje, limpieza, y recubrimiento conductor.

La muestra ha de tener un tamaño de acuerdo con el tamaño del portamuestras que se va a utilizar, por lo que éste debe conocerse antes de cortar la muestra. Los distintos fabricantes tratan de diseñar equipos que se ajusten a las necesidades de los usuarios, por lo que en la actualidad la mayoría de los equipos disponen de portamuestras que admiten muestras relativamente grandes. Hay casos, sin embargo, en los que la probeta objeto de estudio es excesivamente grande. En estos casos, y como alternativa, se emplean las réplicas. Asimismo, y por el carácter no destructivo de esta técnica, se emplea con mucha frecuencia para la observación y caracterización de muestras de interés histórico.

Los fabricantes suministran portamuestras de distintos tipos y tamaños generalmente de latón o aluminio. A veces, sin embargo, ninguno responde a las necesidades de un estudio determinado y es necesario, por tanto, diseñar uno específico.

La muestra ha de fijarse con algún tipo de adhesivo sobre el portamuestras, para asegurar un buen contacto eléctrico a tierra y evitar desplazamientos de la imagen que puedan perturbar tanto la obtención de micrografías como la realización de microanálisis.

Las pinturas de plata y grafito son los adhesivos que normalmente se utilizan. Hay que tener la precaución de dejar secar perfectamente la pintura antes de introducir la muestra en la precámara, para evitar la contaminación del microscopio por la volatilización del disolvente que se llevan.

Otra fuente importante de contaminación, fundamentalmente de hidrocarburos que se depositan en las aperturas, detectores y columna, es la presencia de partículas o capas no conductoras sobre la superficie de las muestras, que por otra parte, perjudican las diferentes imágenes, produciendo áreas de carga en incluso ruido de fondo en las señales de rayos-X. Estos problemas pueden resolverse mediante una buena limpieza de las muestras con disolventes orgánicos, en un baño de ultrasonidos. A continuación ha de secarse con aire comprimido guardándolas posteriormente en un desecador con el fin de evitar la deposición de partículas de polvo.

La limpieza de superficies de muestras metálicas oxidadas es algo más problemática y se debe elegir el método menos agresivo para no disolver o eliminar parcialmente el material de base.

A veces, el método que se emplea para eliminar capas oxidadas es el de utilizar réplicas de extracción. Este es un procedimiento poco agresivo, y, aunque en algunos casos puede eliminar parte de la superficie original, no hay duda que la nueva superficie proporciona más información que la original.

Por último, las muestras no conductoras tales como plásticos, cerámicas, vidrios, réplicas, etc., se cargan durante la irradiación por una acumulación de carga provocando la desviación del haz electrónico y como consecuencia de ello la imagen. Para minimizar en principio este efecto, bastaría con trabajar a muy bajo potencial acelerador. Sin embargo, los potenciales muy bajos limitan la resolución y la profundidad de campo. Además, en la mayoría de los casos no se podría realizar microanálisis por no llegar al potencial de excitación crítico de las líneas características de los elementos presentes. La solución es, por tanto, recubrir la muestra con una película conductora, de espesor comprendido entre 10 y 25 nm.

## 18.2. Metalización

Las técnicas empleadas para mejorar la conductividad de las muestras, para su estudio al MEB/MSE, son la evaporación y el *sputtering*. Ambas conducen a los mismos resultados, pero los mecanismos son distintos.

La elección del material con el que se va a recubrir la muestra dependen fundamentalmente del estudio que se va a realizar. Así, para la observación de imágenes de electrones secundarios el oro y el oro-paladio son los materiales que conducen a los mejores resultados; al ser elementos pesados, producen mayor emisión. Cuando lo que se pretende es realizar un estudio microanalítico es recomendable emplear carbono. El bajo número atómico de este elemento lo hace prácticamente transparente a los rayos-X emitidos por la muestra. También se emplean a veces aluminio, cromo, etc.

Se pueden depositar películas metálicas por ambos procedimientos, pero el recubrimiento con carbono se realiza habitualmente por evaporación. Es posible hacerlo mediante la técnica de *sputtering* empleando un blanco de carbono e iones argón, pero la velocidad de deposición es muy lenta, dado que la velocidad de *sputtering* del carbono es muy baja.

### 18.2.1. Evaporación

La metalización por evaporación se realiza en alto vacío, haciendo pasar una corriente eléctrica. El material con el que se va a hacer el depósito, suele estar colocado sobre una cestilla de un material metálico refractario, generalmente wolframio. La temperatura del material va aumentando hasta que el material funde y se evapora. Los átomos escapan siguiendo una trayectoria en línea recta, hasta ser interceptados por una superficie. Esta técnica también se conoce como calentamiento por resistencia. La figura 18.1 muestra un evaporador convencional.

Existen dos modos de depositar la capa: la evaporación rotatoria y el sombreado. En el primer caso, la muestra a metalizar está sometida durante el proceso a inclinación y giro, lo que da lugar a la formación de una capa continua. El sombreado se hace por depósito bajo un ángulo determinado sobre una muestra estacionaria, lo que origina la formación de una capa discontinua. Se utiliza fundamentalmente para aumentar el contraste por topografía en el caso de muestras con relieve. El sombreado ha de realizarse sobre muestras conductoras y si éste no es el caso, es necesario, previo al sombreado, recubrir la muestra con una película de carbono.



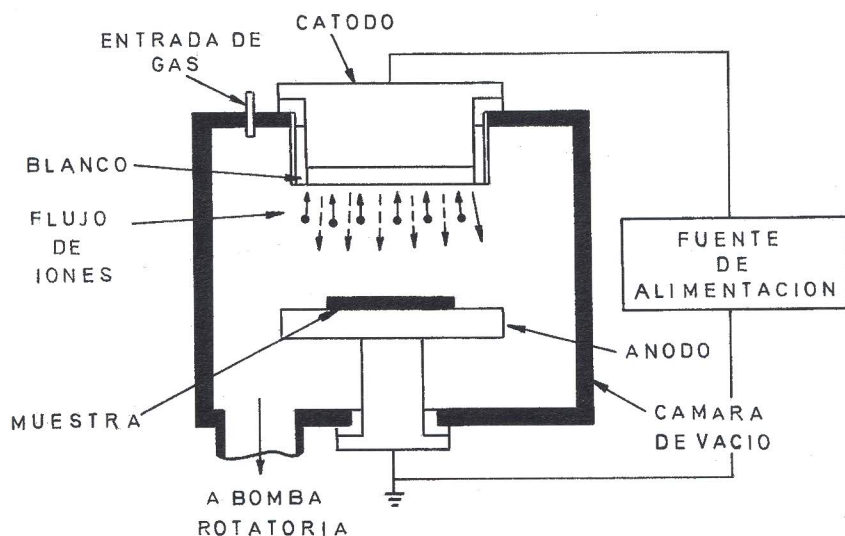


Fig. 18.1. Evaporador.

En el caso de la evaporación rotatoria, la muestra ha de colocarse al menos a 10 cm de la fuente, con el fin de evitar que se dañe por calentamiento. No olvidemos que la temperatura de la fuente suele ser superior a 1273 K. Asimismo, no es conveniente colocar la muestra directamente bajo la fuente, ya que con bastante frecuencia se proyectan sobre la muestra gotas de metal fundido.

Para el sombreado, la muestra ha de colocarse en un portamuestras alineado con la fuente e inclinado entre  $10^\circ$  y  $30^\circ$ .

El material a evaporar, salvo en el caso del carbono, suele estar en forma de hilo de algunas décimas de milímetro de diámetro. Una longitud aproximada entre 5 y 7 cm suele ser suficiente. El espesor de capa depositada puede controlarse colocando en las inmediaciones de la muestra un papel blanco. En el caso de que el metal depositado sea oro, un ligero color gris corresponde a un espesor de un 5 nm. Un color oro moderado corresponde a espesores entre 15 y 20 nm.

#### Materiales empleados

Los metales más empleados en la evaporación son el oro, platino y paladio y las aleaciones de estos metales así como combinaciones de carbono y metales. Todos ellos presentan buena conductividad térmica y, salvo el carbono, alta emisión de electrones secundarios. La diferencia reside únicamente en la naturaleza del depósito; es decir, cuanto más alto es el punto de fusión del metal, más fino es el granulado del recubrimiento, tal y como se muestra en la tabla 18.1 (18.1). También las velocidades altas de evaporación conducen a la obtención de películas de estructura más fina. Sin embargo, si el calentamiento del material a evaporar se realiza muy rápidamente se corre el riesgo de fundir la cestilla.

TABLA 18.1  
Aspecto de la capa depositada en función del material evaporado

Elemento	Z Medio	$T_f$ K	$T_v$ K	Aspecto
C	6	2954	4073	amorfo
Au	79	1336	1738	granulado grueso
Pd	46	1823	1839	granulado moderado
Pt	78	2028	2363	granulado fino
Au-40%Pd	66	*1733	----	granulado grueso
Pt-20%Pd	72	*1993	----	granulado fino
Pt-40%C	50	----	----	granulado muy fino

\*valores aproximados extraídos de Hansen (18.9)

Tanto el espesor como el granulado del recubrimiento se pueden controlar mediante diversos parámetros experimentales. Así, un vacío comprendido entre  $10^4$  y  $10^5$  Pa, una disminución de la velocidad de deposición y de la temperatura de la muestra y un aumento del ángulo entre la fuente y la muestra contribuyen a disminuir tanto el espesor del recubrimiento como el granulado. Como norma general, se puede decir que el oro proporciona buenos resultados para observaciones que no requieran demasiada resolución. Sin embargo, en estudios en que se requieran resoluciones superiores a 10 nm es necesario emplear platino. Otro parámetro a tener en cuenta es el espesor del recubrimiento. Una capa demasiado fina puede ser insuficiente para eliminar los fenómenos de carga y una excesivamente gruesa puede enmascarar detalles importantes de la superficie.

El recubrimiento con carbono se empleó por primera vez como soporte en MET, y posteriormente en MSE para aumentar la conductividad de muestras sobre las que se va a realizar microanálisis. También se emplea como recubrimiento previo al del metal evaporado para mejorar la adhesión entre éste y la muestra. Este es un problema que se plantea habitualmente con las réplicas. Este tipo de muestras son difíciles de recubrir directamente con metal evaporado, y se ha comprobado experimentalmente que se obtienen mejores resultados cuando se hace un recubrimiento previo con carbono.

El carbono es, desde el punto de vista microanalítico, el elemento más adecuado. Su baja masa atómica hace que no sea prácticamente detectable la emisión de rayos-X característicos y que se pueda considerar despreciable la absorción de radiación característica de baja energía y baja intensidad, y emisión de radiación característica del elemento o elementos que constituyen el recubrimiento, pudiendo enmascarar la verdadera composición de la muestra.

El aluminio se utiliza con cierta frecuencia, ya que permite obtener imágenes de electrones secundarios con buena calidad de imagen, permitiendo la realización de microanálisis. En este caso hay que tener en cuenta que los rayos-X característicos de elementos ligeros tales como Na, Mg y Si pueden ser absorbidos por la película de aluminio.

La evaporación con carbono se realiza mediante dos electrodos de grafito puro. Uno de ellos, acabado en punta, se fija con un muelle y se pone en contacto con la superficie del otro, que ha de ser plana y oblicua. Es importante que el área de contacto entre los dos electrodos sea la mínima posible para permitir que el arco salte bien. Después de hacer alto vacío en la campana, se establece el arco haciendo pasar una corriente eléctrica de unos 20 A a través de los dos electrodos, entre los que se ha establecido una diferencia de potencial de unos 30 V. El carbono se evapora y se forma la película. La mayoría de los equipos comerciales disponen de, al menos, cuatro electrodos con alimentaciones separadas. Ello permite, en ciertos casos como por ejemplo en el de las réplicas, depositar primero la capa de carbono y a continuación el metal, sin necesidad de romper el vacío.

### Espesor del recubrimiento

El espesor de la capa depositada no es fácil de medir, y únicamente se hace en trabajos de investigación en los que éste es el objeto del estudio. Existen diversos métodos a partir de rayos-X emitidos y electrones retrodispersados. Ambas señales son proporcionales al espesor del recubrimiento. Otro método empleado es el de la observación al MET de esferas de látex recubiertas simultáneamente con la muestra. Una técnica más sofisticada para hacer este tipo de medidas es mediante métodos de interferencia doble o múltiple del haz.

La expresión  $T = M \cos \alpha / 4R d$  permite calcular de un modo aproximado ( $\pm 50\%$  de error) el espesor  $T$  del recubrimiento, siendo  $M$  la cantidad de material evaporado,  $R$  la distancia entre la fuente y la muestra,  $d$  la densidad del material depositado y  $\alpha$  el ángulo entre la normal a la muestra y la dirección de evaporación. No da cuenta, sin embargo, de la geometría del evaporador ni de la cantidad de metal que se alea con el material de la cestilla.

Kerrick (18.2), en un trabajo en el que estudia la influencia del espesor del recubrimiento de carbono en el microanálisis, describe un procedimiento para estimar dicho espesor mediante la coloración que toma una pieza pulida de latón (tabla 18.2), sobre la que se deposita una gota de aceite. Este autor concluye que mediante esta técnica, se puede determinar el espesor del depósito con una precisión de  $\pm 2,5$  nm.

### 18.2.2. Sputtering

Esta técnica se basa en la erosión de átomos de una muestra metálica mediante un plasma energético (Ar o N ionizado), en condiciones de bajo vacío (1 Pa). Los átomos de metal liberados se desvían por el gas residual produciéndose una fuente multidireccional que conduce a la formación de un depósito. Experimentalmente se ha comprobado que, en el caso de muestras con relieve, el recubrimiento es mucho más continuo que el obtenido por evaporación. El proceso se puede



TABLA 18.2  
**Estimacion del espesor de la capa depositada de carbono en  
 funcion de la coloracion que toma una pieza de laton**

Espesor aproximado, nm	Color
15	naranja
20	rojo índigo
25	azul
30	verde azulado
35	azul verdoso
400	verde pálido
450	oro plata

describir básicamente así: Los iones del plasma transfieren su momento al metal y el exceso de energía lo elimina éste mediante la expulsión de un átomo. La trayectoria general de los átomos de metal liberados es hacia el ánodo, pero pueden ser desviados por el gas residual de manera que los átomos pueden colisionar con otros durante su recorrido, coalesciendo para formar un núcleo que luego es interceptado por la superficie de la muestra. La energía producida por el choque de los iones con el metal puede liberarse en forma de calor. Esto obliga a separar la muestra del blanco entre 2 y 5 cm para evitar, en lo posible, el daño en la muestra por radiación de calor. Además, el calentamiento influye sobre el granulado del depósito. El mecanismo de crecimiento de la película depositada por *sputtering* es el mismo que el del depósito evaporado. Recordemos que una disminución de la temperatura de la muestra reduce la movilidad de los átomos superficiales, conduciendo a menos y más uniformes núcleos por unidad de área. Durante la última etapa de crecimiento de la película, una disminución de la temperatura favorece la formación de gran cantidad de pequeñas zonas aisladas de metal condensado que reducen el granulado de la película.

La velocidad de depósito de los átomos metálicos depende de las características del plasma y de la naturaleza del metal. Los gases habitualmente empleados son argón y nitrógeno, y se eligen ya que sus diámetros eficaces son relativamente grandes. Los átomos menores, tales como los de hidrógeno, son de baja eficiencia por no transportar suficiente momento para sacar átomos de los metales nobles. Empleando gases más pesados, los diámetros eficaces de los iones plasma son más similares a los de la muestra metálica, con lo que aumenta la probabilidad de expulsión de átomos metálicos. El *sputtering* con argón es por tanto más rápido que con nitrógeno debido a la mayor masa atómica del argón.

A veces se emplea aire para formar el plasma, pero esto provoca un gran número de problemas, entre los que destacaremos los siguientes:

- El *sputtering* es poco eficaz, ya que el aire está constituido por elementos de baja masa atómica.
- La velocidad de depósito es baja.
- El vapor de agua y las partículas presentes en el aire pueden contaminar la muestra.

Por todo ello, los recubrimientos así obtenidos son de muy baja calidad. Existen diversas técnicas de *sputtering*, el *sputtering* por haz iónico, el *sputtering* por corriente directa o diodo frío. La figura 18.2 es un esquema del diodo.

#### Materiales empleados y espesor del recubrimiento

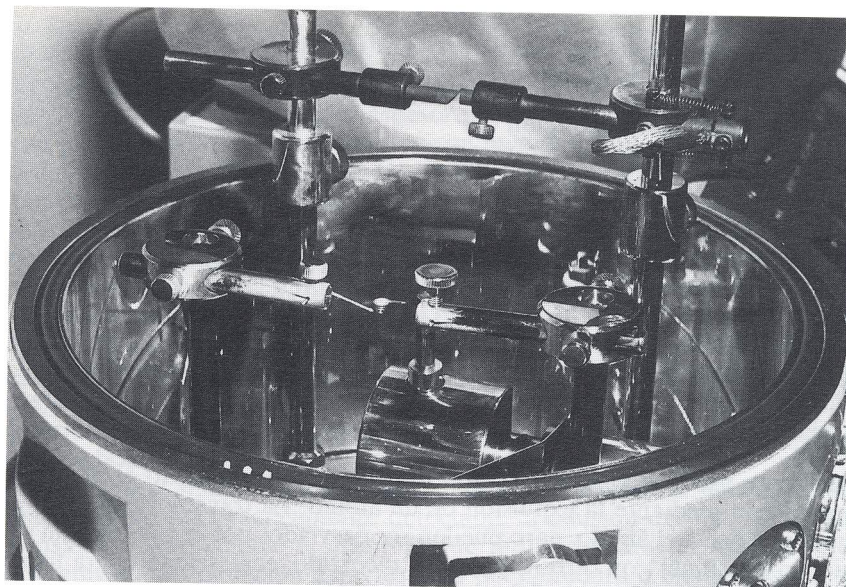
Como cátodo se emplean metales nobles y sus aleaciones, así como diversos metales refractarios tales como níquel, cromo, tantalio, wolframio, etc. La posibilidad de emplear este tipo de materiales es lo que diferencia básicamente esta técnica de la evaporación térmica. Los metales refractarios se emplean fundamentalmente para MEB de alta resolución, mientras el Au y Au-Pd se emplean para estudios en los que no se requieren aumentos muy elevados. Cuanto más alto es el punto de fusión del metal a depositar, más amorfo es el depósito y menor su granulado.

Al igual que en el caso anterior, se puede estimar el espesor  $T$  del depósito, en nm, a partir de la ecuación propuesta por Echlin (18.3)

$$T = CV \, td/10$$

$C$  = descarga del plasma en mA.

$V$  = voltaje de aceleración en keV.



**Fig. 18.2.** *Sputtering de diodo.*

$t$ =tiempo en minutos.

$d$ =constante que depende del gas y de la naturaleza del cátodo, que toma el valor  $d=5$  en el caso de nitrógeno y oro y  $d=2$  para argon y oro.

Esta ecuación se aproxima bastante en el caso de muestras planas o con poco relieve y da una buena estimación en el caso de muestras rugosas.

Las condiciones óptimas para la preparación de recubrimientos conductores con granulado fino son las de emplear velocidades relativamente bajas de depósito (con bajo voltaje y baja corriente). No es recomendable preparar recubrimientos con espesores superiores a 30 nm, ya que los detalles superficiales pequeños pueden quedar enmascarados.

### 18.2.3. *Ventajas e inconvenientes del empleo de una u otra técnica*

El empleo de una u otra técnica depende fundamentalmente del tipo de muestras a observar. Así, las muestras con relieve presentan un recubrimiento más uniforme si éste se ha realizado mediante *sputtering*. La evaporación rotatoria da mejores resultados en el caso de muestras pulidas. El sombreado se realiza sobre muestras conductoras o previamente recubiertas con carbono. Otro caso es el de las réplicas. Aquí es preferible emplear el *sputtering*, ya que en este caso la adhesión del depósito evaporado es buena. En el caso de no disponer de *sputtering*, y como alternativa, se depositará carbono y a continuación el metal.

Por último, y como recomendación, señalaremos que la limpieza de los equipos es de vital importancia a la hora de obtener buenos recubrimientos. Tanto el evaporador como el *sputtering* deben limpiarse con cierta frecuencia a fin de evitar cualquier tipo de contaminación en las muestras. Siempre que se vaya a cambiar de elemento a depositar se ha de procurar hacerlo lo más exhaustivamente posible. No es extraño encontrarse a veces, en muestras recubiertas, con las sorpresas de observar la presencia de algún elemento inesperado (por ejemplo, oro en un mineral de hierro), resultado siempre de una contaminación procedente del equipo. Si el usuario no tiene experiencia puede obtener resultados completamente erróneos. Finalmente, las condiciones óptimas de trabajo del MEB/MSE con muestras recubiertas son las de emplear baja tensión de aceleración, entre 10 y 20 kV y pequeño tamaño de haz, sobre todo en el caso de muestras sensibles a la temperatura.

### 18.3. **Preparación de réplicas**

La réplica es una reproducción exacta de la superficie de un material que se prepara para su observación al microscopio. Tal como se comentó en la introducción, la réplica es una buena



alternativa de la que dispone el investigador cuando no le es posible realizar el estudio sobre la muestra original.

Un estudio que se requiere con mucha frecuencia en el campo de la Ciencia e Ingeniería de materiales es el análisis de fallos en componentes estructurales. Frecuentemente, el fallo se produce en una estructura que, como es lógico, no puede trasladarse al laboratorio. En estos casos es posible trasladarse al lugar y obtener réplicas de las zonas de interés, para a continuación emitir el informe, tras realizar el estudio en el laboratorio.

También se emplean en fractografía, bien para proteger al superficie a examinar de fenómenos de oxidación y corrosión, o bien para limpiar la zona de estudio.

Otra de las aplicaciones más importantes que tiene esta técnica es el estudio de piezas de interés histórico. Estas piezas suelen ser demasiado grandes para el MEB; además, el hecho de ser piezas únicas impide la toma de muestras. Por otra parte, mediante esta técnica es posible estudiar muestras biológicas como huesos, dientes que no pueden ser observadas al MEB sin no es con una preparación adecuada.

De modo general se puede establecer que esta técnica, por ser no destructiva, se emplea en todos aquellos casos en los que el material no puede prepararse metalográficamente por los métodos convencionales. Hay que señalar no obstante que mediante réplicas sólo es posible realizar observaciones de la topografía de la muestra con la señal de electrones secundarios. El resto de señales que dependen del número atómico no aportarán, evidentemente, ningún tipo de información; como excepción mencionaremos el caso de las réplicas de extracción, ya que en este caso se desprende parte del material original quedando, por tanto, depositado en la superficie. Esta técnica es muy empleada para estudiar la morfología y composición de inclusiones en diferentes tipos de materiales metálicos.

### *18.3.1. Método de preparación*

Las réplicas pueden ser de una etapa o de dos etapas. Las primeras son copias negativas de la muestra original, lo que habrá de tenerse muy en cuenta a la hora de interpretar las observaciones. Las de dos etapas son ya exactamente reproducciones de la superficie original. Los materiales que se emplean en los dos casos son los mismos y han de cumplir una serie de requisitos. Han de tener una baja tensión superficial para que el mojado sea bueno y rápida polimerización sin la aparición de arrugas durante ella. También es necesario que se pueda levantar fácilmente de la superficie de la muestra sin distorsionarse y, por último, han de resistir el vacío, el calor y la irradiación electrónica. Habitualmente se emplea el acetato de celulosa aunque en la actualidad se dispone de una gran cantidad de materiales. Cabe destacar entre ellos los materiales para impresiones dentales. Estos materiales dan muy buenos resultados en el caso de muestras que presentan una superficie con mucho relieve. La reproducción es mucho mejor que la que se obtiene con el acetato de celulosa.

A continuación vamos a describir la técnica de preparación de réplicas de acetato de celulosa ya que quizá es la que más se ha empleado tradicionalmente, por proporcionar imágenes con buena resolución. El acetato de celulosa se suministra tanto en cintas de aproximadamente 15mm de anchura y diferentes espesores, como hojas de 100 mm x 120 mm. La elección de una y otra dependerá, sobre todo, del tamaño de la zona sobre la que se va a hacer la réplica.

El procedimiento que se sigue para preparar la réplica es el siguiente. Una vez preparada la superficie de la muestra, ya sea metalográficamente o si se trata de una fractura o de una superficie que no requiere preparación previa tras realizar una minuciosa limpieza, se deposita, con la ayuda de una pipeta, una pequeña cantidad de acetona sobre la zona de interés. También proporciona buenos resultados el acetato de metilo. Transcurridos unos cinco segundos se coloca el trozo de acetato de celulosa ejerciendo sobre él una ligera presión durante unos dos minutos para asegurar un buen contacto. A continuación se deja secar durante unos diez minutos, transcurridos los cuales se despegar de la superficie original. Generalmente se prepara más de una, ya que las primeras pueden contener partículas de polvo. La réplica ha de guardarse a continuación en un lugar fresco. Muy importante para la obtención de una buena réplica es el tiempo de permanencia de ésta sobre la superficie de la muestra, que se conoce como tiempo de curado. Si éste no es suficiente, se albeará al despegarla e incluso puede llegar a romperse e incluso disolverse. Por otra parte, si se deposita una excesiva cantidad de disolvente, la réplica puede romperse. Es conveniente despegar la réplica mediante un movimiento continuo, para evitar la aparición de estrías.

La réplica se pega a un portamuestras con pintura conductora para asegurar un buen contacto y se metaliza tal como se describió en 18.2. Hay que tener en cuenta que un sobrecalentamiento de la réplica durante la metalización puede perjudicarla, produciéndole grietas e incluso llegando a fundirla.



Conviene hacer la observación de la réplica con un potencial de aceleración inferior a 20 kV y con un tamaño de haz pequeño.

La réplica de dos etapas se obtiene realizando una réplica de la réplica negativa. Fukami (18.4) describe una técnica de preparación de réplicas para MET válida para el MEB, que es precisamente una técnica de dos etapas. El procedimiento seguido es el de sombrear la réplica con cromo, germanio u óxido de titanio, cuando el máximo número de aumentos que se van a emplear van a ser x5000, Pt-Pd (8:2) o bien platino sólo si se va a trabajar con aumentos superiores, tras haberla recubierto con carbono. A continuación se disuelve el acetato de celulosa con acetona. De este modo se obtienen una réplica positiva.

Recientemente se ha comprobado que el método de dos etapas que proporciona los mejores resultados es el que emplea primero una impresión negativa o molde realizado con un material de impresión dental de base silicona; la réplica positiva se hace a continuación colocando en el molde una resina epoxy. Numerosos investigadores han ensayado diferentes combinaciones de materiales con el fin de mejorar la resolución de las réplicas. Rosse (18.5) describe el método experimental de preparación de este tipo de réplicas, para aplicaciones antropológicas, describiendo además el comportamiento de diferentes tipos de materiales.

Asimismo, Scott (18.6) hace un estudio de las réplicas obtenidas de piezas antropológicas para su observación al MEB a bajos aumentos. Para ello hace una combinación de diferentes materiales para impresiones dentales con cinco resinas epoxy diferentes.

### 18.3.2. Réplicas de extracción

Una de las aplicaciones más importantes que tiene esta técnica es en el campo de la ciencia de los materiales metálicos. En ocasiones es necesario estudiar la morfología y la composición de partículas de segunda fase, que por su tamaño presentan serias dificultades, ya que siempre hay un efecto matriz. Todos estos problemas se pueden simplificar mediante el empleo de estas réplicas.

Básicamente la técnica consiste en atacar, química o electrolíticamente, una muestra plana y pulida con el fin de resaltar, sin disolver, las partículas objeto de estudio. A continuación, se recubre con una capa de carbono, para finalmente disolver la muestra con otro reactivo químico, quedando, por tanto, liberada la réplica con las partículas de segunda fase. Quizá la parte más delicada del proceso es la liberación de la réplica, puesto que es necesario emplear un reactivo que disuelva el material base sin disolver la segunda fase. Además, el ataque no debe ser muy fuerte para evitar que el desprendimiento de burbujas rompa la réplica. Inmediatamente después de que la réplica flote hay que sacarla y depositarla en un vaso con agua para eliminar los restos de reactivo. La metalización con carbono ha de hacerse por evaporación y en portamuestras que permita el giro y la inclinación de la muestra. De otro modo no se conseguirá una capa continua. A veces se realiza un sombreado posterior, con el fin de resaltar la forma tridimensional de las partículas extraídas.

### 18.4. Preparación de muestras pulidas

Una de las ventajas más importantes que presenta el MEB es la posibilidad de observar muestras sin necesidad de hacer preparación alguna, mediante imágenes de contraste topográfico, siendo necesario únicamente desengrasar la superficie, para evitar contaminación por hidrocarburos. En el caso de muestras no conductoras basta con metalizarlas.

No obstante, la preparación metalográfica es de vital importancia para estudios microestructurales y/o microanalíticos.

Vamos a comentar brevemente a continuación algunas de las cuestiones previas la preparación propiamente dicha y que, por tanto, son comunes a todos los tipos de muestras.

Las muestras objeto de estudio suelen ser piezas de dimensiones superiores a las de los portamuestras, por lo que es necesario cortarlas para obtener probetas. Hay que elegir el método de corte más apropiado para cada tipo de material para evitar, tanto alteraciones de la microestructura por efecto del calentamiento como deformaciones superficiales. Las máquinas de corte con discos abrasivos permiten intercambiar los discos y emplear el más adecuado para cada tipo de material (alúmina, carburo de silicio, diamante, etc.).

A continuación las muestras se embuten para facilitar su manejo. El montaje puede hacerse en caliente en una prensa o bien en frío si la muestra es susceptible de alterarse por el efecto de la temperatura o de la presión. Posteriormente se pulen mecánicamente debastándolas primero con papeles abrasivos de carburo de silicio, desde tamaños de grano grueso pasando hasta el más



fino, eliminando en cada paso las distorsiones introducidas con el papel anterior. El pulido final se realiza sobre paño y con abrasivos de alúmina. Dependiendo del tipo de material y con el fin de obtener superficies lo más libres de distorsiones posible, es necesario a veces realizar un pulido final con pasta de diamante o magnesia. Las muestras una vez pulidas se lavan bien con disolventes orgánicos o con agua y alcohol, para eliminar todos los restos abrasivos. A continuación se secan con aire caliente. Hay que tomar algunas precauciones durante la limpieza de muestras en las que se quieran estudiar productos de corrosión. Una limpieza muy vigorosa puede eliminar productos.

Aunque el pulido mecánico conduce a superficies de alta calidad, hay casos en los que esta preparación es insuficiente. No olvidemos que siempre existe una capa distorsionada de unos 100 nm. Estas capas impiden, por ejemplo, realizar diagramas de canalización de electrones y en este caso es recomendable realizar bien un pulido químico después del mecánico con el fin de eliminar dicha capa o mejor todavía realizar un pulido electrolítico. Existen multitud de trabajos donde se describe esta técnica, así como las condiciones experimentales para los distintos tipos de materiales.

También en el caso de emplear la señal de catodoluminiscencia para la detección y determinación de impurezas en niveles de concentración muy bajos, así como en el caso de materiales semiconductores, para localizar defectos, se requieren muestras cuya preparación superficial esté lo más libre como sea posible de defectos.

#### 18.4.1 Preparación de minerales y rocas

La mayoría de las rocas están constituidas por una gran variedad de minerales de diversos tamaños de grano. Muchos de estos minerales son pequeños y se presentan íntimamente ligados a otras fases, por lo que su identificación óptica presenta grandes dificultades. A menudo es necesario emplear muestras delgadas pulidas y utilizar microscopios ópticos de luz transmitida y luz polarizada. Por otra parte, las diferentes fases que constituyen las rocas son de propiedades mecánicas muy distintas, lo que hace difícil la preparación de muestras delgadas pulidas, sobre todo en el caso de tener que realizar microanálisis, ya que en este caso se requieren superficies pulidas de alta calidad. Una preparación inadecuada conduce a la observación de relieve, rayas, contaminación por paso de una fase sobre otra, arranque selectivo de una fase, etc.

Debido a la gran diferencia de comportamiento que tienen los distintos minerales, es difícil sugerir una técnica de preparación de muestras válida para todos los tipos. Por tanto, la mejor es la que experimentalmente conduce a los mejores resultados variando paños, abrasivos, etc.

El procedimiento más empleado para preparar muestras de minerales y productos molidos consiste en montar primeramente las muestras en baquelita, o en los diferentes tipos de resinas (epoxy, plástico, etc.). A continuación el pulido se realiza en cinco fases:

- a) Desbaste.
- b) Impregnación.
- c) Pulido grueso en pasta de diamante.
- d) Pulido fino con alúmina 0,3  $\mu\text{m}$ .
- e) Pulido final con alúmina 0,05 y 0,1  $\mu\text{m}$ .

La preparación de muestras delgadas se realiza cortando una pequeña rodaja de mineral. Tras impregnarla se mantiene sobre el portaobjetos de vidrio debastándola a continuación hasta unos 25-30  $\mu\text{m}$ , aproximadamente. A continuación se pule.

El pulido se realiza en tres fases:

a) Desbaste en un paño a 600 rpm impregnado en diamante de 3  $\mu\text{m}$  y un lubricante para pulido.

b) Pulido en un paño a 600 rpm con alúmina de 0,3  $\mu\text{m}$ .

c) Pulido final en paño suave de pelo corto y alumina de 0,05  $\mu\text{m}$  a una velocidad de 160 rpm.

Por supuesto, entre cada paso la probeta ha de limpiarse en ultrasonidos y secarla bien.

En los dos tipos de muestras y siempre que se sospeche la presencia de fisuras o poros es conveniente realizar tras el desbaste una impregnación para de este modo, impedir durante el pulido cualquier tipo de contaminación. La impregnación consiste en rellenar dichos poros o grietas con bálsamo del Canadá o bien con resinas artificiales. Generalmente, la impregnación se hace en vacío, que se rompe periódicamente con el fin de facilitar la entrada del medio impregnante en dichos defectos. La elección de la resina a emplear depende fundamentalmente de la temperatura que requiera dicha sustancia para endurecer, ya que el mineral puede sufrir a esas temperaturas alteraciones en su estructura.

Finalmente, para observar las muestras será necesario recubrirlas con una capa conductora tal y como se ha descrito anteriormente.



### Vidrios

Estos materiales se caracterizan por su escasa porosidad y por su dureza uniforme, lo que hace que la preparación metalográfica sea mucho más sencilla que en el caso de muestras geológicas y cerámicas. El montaje de estas muestras suele hacerse en resinas epoxy o en baquelita conductora (baquelita ámbar + 10% C o Cu), dado que ninguna de ellas es soluble en los disolventes que se emplean habitualmente para hacer las limpiezas superficiales de las muestras ni en los lubricantes empleados en el pulido. La baquelita conductora tiene además una ventaja clara: No es preciso hacer un contacto entre la muestra y el portamuestras tras la metalización.

El pulido se realiza como es habitual; desbaste con papeles de carburo de silicio hasta el 600 y a continuación pulido con pasta de diamante empleando tamaños desde 6 a 0,25  $\mu\text{m}$ . Es recomendable limpiar la muestra en ultrasonidos entre cada dos pasos con el fin de eliminar los restos de abrasivos, y evitar la formación de rayas superficiales. A veces no es tan importante la presencia de alguna raya como que la muestra esté plana, sobre todo cuando se trata de obtener perfiles de elementos a lo largo de la muestra.

Uno de los defectos más habituales que se producen en la preparación de este tipo de muestras es la formación de bordes redondeados. Este fenómeno puede evitarse empleando resinas constituidas por fibras de vidrio diseñadas para proteger el borde de la muestra durante el pulido.

Otro método muy eficaz para evitar este problema consiste en depositar una película conductora de plata o aluminio o protegerla mediante electrodeposición con cobre o níquel. A continuación la muestra se monta y pule convencionalmente.

### Cerámicos y refractarios

La preparación metalográfica de muestras cerámicas y refractarias presenta problemas que a menudo son extremadamente difíciles de resolver. Un método de desbaste y pulido inapropiado puede conducir a errores muy serios durante un análisis. Al igual que en el caso de las muestras de minerales, estos materiales contienen granos de muy diferente dureza, lo que conduce a la formación de relieves durante la etapa de pulido.

La preparación de este tipo de materiales para realizar análisis cuantitativo preciso, es siempre considerablemente más laborioso que en el caso de vidrios y muestras metálicas.

Existe bastante bibliografía sobre el pulido de estos materiales, fundamentalmente debido al trabajo de los mineralogistas y geólogos, ya que en muchos aspectos la preparación de muestras refractarias y petrológicas son similares; sin embargo, algunos refractarios tales como los ladrillos de cromo o magnesita, estables a temperatura y presión normales, han de protegerse de la hidratación mediante la impregnación.

La preparación de estos materiales requerirá, por tanto, desbaste y pulido libres de agua y protección frente a la humedad atmosférica. Algunos autores (18.8) recomiendan emplear vidrios de bajo punto de fusión calcinados para impregnar refractarios muy porosos. La razón que dan es que de este modo es mayor la semejanza de módulos elásticos entre el refractario y el vidrio que entre el primero y la resina epoxy o cualquier otra resina plástica empleada habitualmente para impregnación, lo que conduce, por tanto, a una mayor superficie pulida. El único problema que es necesario destacar es que la mayoría de estos vidrios de bajo punto de fusión son de composiciones complejas y la impregnación se debe llevar a cabo entre 673 y 873 K, lo que puede dar lugar a reacciones inesperadas con los granos de la muestra.

El estudio de las superficies de fractura de estas muestras, al igual que en los materiales metálicos, aporta una gran información. La precipitación en frontera de grano se observa y caracteriza con más facilidad en una fractura que sobre una muestra pulida, ya que durante esta operación los precipitados pueden eliminarse o contaminarse. Estos materiales presentan generalmente fractura a lo largo de sus fronteras de grano y, los precipitados intergranulares se concentran en las superficies de fractura, permitiendo su identificación de un modo sencillo, sobre todo cuando los bordes de grano son muy delgados y contienen una pequeña cantidad de precipitados.

Observación al MEB/MSE de vidrios y materiales cerámicos

Salvo raras excepciones, los vidrios y los materiales cerámicos son malos conductores. Para evitar fenómenos de carga local sobre la superficie que provocan la distorsión y la desviación del haz electrónico, se pueden utilizar dos procedimientos alternativos. Metalizar la muestra o bien trabajar con bajo potencial de aceleración. Los materiales más empleados en la metalización de este tipo de muestras son el carbono, aluminio, cobre, oro y el oro-paladio. La elección de uno u



otro depende como siempre del tipo de estudio que se desea realizar y de los materiales que constituyen las muestras, de manera que, por ejemplo, el aluminio, que es un constituyente muy común de los vidrios y cerámicos no debe emplearse si hay que realizar microanálisis de este elemento. Hay autores que recomiendan el berilio por proporcionar bajo ruido de fondo y ser prácticamente transparente para todas las longitudes de onda. La preparación de una película conductora con este elemento presenta, sin embargo, dos problemas muy claros e importantes, que son:

- a) dificultad de obtención de un recubrimiento de espesor constante
- b) el berilio es un elemento venenoso.

El riesgo que lleva consigo el manejo de este elemento no compensa desde nuestro punto de vista en absoluto la mejora introducida.

La técnica de observación de muestras aislantes a bajos potenciales de aceleración se está generalizando cada vez más, debido a la buena imagen que proporcionan los MEB con filamentos de emisión de campo (FE) a bajos potenciales. También hay que señalar que, tanto en los materiales cerámicos como en los vidrios, es posible resaltar la microestructura o la textura superficial disolviendo parcialmente la fase vítrea mediante un ataque adecuado para cada muestra. En el capítulo 23 se recoge, de una manera esquemática, los diferentes ataques que se pueden emplear en este tipo de materiales, así como algunos detalles más sobre la preparación de muestras.

#### 18.4.3 Preparación de materiales metálicos

La preparación metalográfica de muestras metálicas generalmente no presenta problemas si se elige el procedimiento adecuado para cada tipo de material y estudio que se quiera llevar a cabo.

El montaje de las muestras se realiza sobre baquelita en el caso de que no sea significativa la influencia de la presión y temperatura a la que vayan a estar sometidas en la prensa, o bien en otro tipo de resinas que polimerizan a baja temperatura. En este tipo de resinas, es posible conseguir que la polimerización se realice a temperatura ambiente, sin más que disminuir la cantidad de activador.

En el caso de muestras constituidas por combinaciones de dos materiales diferentes (materiales compuestos, muestras con recubrimientos, etc) en que uno de ellos no sea muy buen conductor es recomendable realizar el montaje sobre baquelita conductora. También se utiliza si se desea estudiar el borde de la muestra. Una baquelita normal producirá descargas impidiendo tanto la visualización de la imagen como la realización de microanálisis. En este último caso, y si no se dispone de baquelita conductora, es conveniente metalizar la muestra. Este método se emplea habitualmente para poder estudiar el perfil correspondiente a la sección de una superficie no plana, tal como una fractura, con el fin de preservar los detalles de la superficie de fractura y determinar parámetros de rugosidad o distribución de orientaciones de dicha superficie.

El desbaste se realiza sobre papeles de carburo de silicio, teniendo cuidado siempre de girar la muestra 90° para cambiar la dirección de las rayas en cada desbaste. Existen materiales, sin embargo, que presentan ciertos problemas durante este paso. Tal es el caso de los materiales muy blandos, como por ejemplo, el plomo y su aleaciones. Se recomienda no emplear los papeles abrasivos, ya que los granos de SiC se depositan primero sobre la superficie de la muestra para a continuación, y a medida que se prosigue el desbaste, irse incrustando cada vez más. Por este motivo, cuando hay que desbastar un material blando se emplea el microtomo. La capa superficial que está muy distorsionada se elimina realizando ciclos repetidos de pulido y ataque. También los metales y aleaciones con estructura cristalina hexagonal tienden a maclarse durante el pulido y de una manera muy llamativa durante el desbaste, lo que enmascara completamente la microestructura. En este caso se deben realizar ciclos repetidos de pulido y ataque, tras finalizar el desbaste, o pasar directamente a realizar ciclos de pulido y ataque químicos, si la muestra estaba suficientemente lisa para no ser indispensable el desbaste (por ejemplo, material laminado) o bien pasar a realizar directamente un pulido electrolítico.

El primer pulido mecánico de las muestras se realiza en paño de billar y con una suspensión de alúmina alfa de, aproximadamente, 0,3  $\mu\text{m}$ . Una vez eliminadas todas las rayas gruesas del papel de esmeril se pasa al pulido final, que depende ya de cada tipo de material.

Así, en la mayoría de los casos (cobre, latones, bronce, aceros, aleaciones férricas, aleaciones refractarias, etc.) se realiza en paño suave de pelo corto con pasta de diamante y un lubricante para pulido. En el caso del aluminio y metales blandos el pulido final se realiza sobre paño suave de pelo corto y una suspensión de magnesia, a una velocidad relativamente baja (300 rpm).

Por último, el pulido final de los materiales muy blandos, tales como el plomo y sus aleaciones, se lleva a cabo con el plato parado, sobre paño muy suave y una suspensión de alúmina gama de 0,05  $\mu\text{m}$ . El paño de gamma proporciona muy buenos resultados.

Hay que evitar mantener la muestra estática durante el pulido. Ello evita la formación de

colas de cometa. También es necesario siempre limpiar bien la muestra entre las etapas de pulido.

La muestra, una vez pulida, está en las mejores condiciones para realizar el estudio microanalítico. Sin embargo, a veces es también muy importante observar la morfología y distribución de las fases que constituyen la muestra, por lo que es conveniente realizar un ligero ataque. La naturaleza selectiva de los ataques permite revelar las diferentes fases. Un ataque muy severo puede conducir a la disolución parcial y a veces incluso total de alguna de las fases, apareciendo pozos de corrosión. El ataque se puede realizar tanto químicamente como electrolíticamente. Existe una bibliografía muy amplia sobre este tema; tal es el caso de *Metals Handbook*, vol.9 (18.7), en el que se dan diferentes reactivos para el ataque de los diferentes metales y aleaciones, así como las condiciones experimentales en función de lo que interese revelar. No consideramos necesario, por tanto, incluir aquí nada al respecto.

Uno de los estudios que con más frecuencia se lleva a cabo en los materiales metálicos es el estudio de la naturaleza de inclusiones, así como los productos de corrosión que originan fallos en las piezas. En estos casos hay que tener un gran cuidado durante el proceso de preparación de la muestra, con el fin de no arrancar los productos que van a ser objeto de estudio. Este tipo de observación se hace sobre muestras pulidas, ya que el ataque puede disolver las inclusiones y los productos de corrosión.

#### 18.4.4 Preparación de materiales biológicos

Puesto que la preparación de muestras es quizás la parte fundamental del estudio al MEB de los materiales biológicos, se describirá en el capítulo de aplicaciones.

#### 18.4.5 Preparación de muestras hidratadas

##### Suelos y arcillas

El estudio de este tipo de materiales requiere la eliminación del fluido, que suele ser una solución acuosa, en la muestra previamente a realizar la observación. Si la muestra posee un elevado grado de humedad o tiene tendencia a contraerse durante el secado es bastante difícil secarla sin alterar la estructura original.

Existen diferentes técnicas para eliminar el fluido de los poros en este tipo de materiales:

1. Secado en mufla.
2. Secado al aire.
3. Secado por humedad.
4. Secado por sustitución
5. Secado por congelación
6. Secado por punto crítico

Las dos primeras técnicas son claras. La tercera consiste en secar la muestra bajo humedad controlada. La cuarta consiste en reemplazar el fluido del suelo por un líquido de baja tensión superficial, como metanol, acetona o isopentano, y a continuación secar. Las técnicas quinta y sexta son las que emplean habitualmente los biólogos y los médicos.

La técnica que se emplea con más frecuencia en el caso de muestras con bajo contenido en humedad y suelos rígidos es el secado al aire, mientras que los suelos de textura frágil requieren un secado rápido. Una vez que la muestra está seca se puede tomar una parte para estudiar su fractura o bien, si se desean estudiar algunas partículas de la superficie, éstas se pueden aislar depositando un material adhesivo sobre la superficie de la muestra, despegándolo a continuación.

##### Polímeros

La mayoría de los polímeros contienen agua. El estudio de las características superficiales de estos materiales obliga a que durante la preparación se tomen precauciones para no dañar la superficie. Las técnicas de preparación empleadas habitualmente son el secado al aire, secado por punto crítico, criofractura y secado por congelación.

#### 18.4.6 Preparación de muestras patrones para microanálisis

La obtención de buenos resultados microanalíticos con una microsonda electrónica depende de muchos factores, tal como se ha comentado en el capítulo 16. El microscopista ha de saber elegir



para cada caso particular las condiciones más adecuadas de trabajo, potencial de aceleración, intensidad de corriente, ángulo de emergencia, método de corrección de resultados y patrones.

La elección y preparación de patrones es quizás uno de los temas que requiere más experiencia, pero incluso conociendo bien el tema es a veces muy difícil disponer del más adecuado en cada caso. Para materiales metálicos se utilizan generalmente patrones de elementos puros, por lo que quizás se puede considerar que es el caso más sencillo. Sin embargo, el microanálisis de materiales geológicos, vidrios y cerámicos, materiales biológicos, etc., presenta más dificultades. Existen en el mercado ya un gran número de muestras sintéticas de óxidos, silicatos y sulfuros bien caracterizados, pero evidentemente no cubren todas las necesidades, además suelen ser muy costosas. Por tanto, el usuario debe tratar de preparar un archivo de patrones lo más amplio posible para que cubra su especialidad, bien adquiriéndolos en el mercado o bien preparándolos él mismo con cuidado, ya que un patrón requiere un alto grado de homogeneidad. A continuación ha de analizarse por los métodos clásicos. La preparación metalográfica ha de realizarse tal y como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, en el microanálisis de materiales no conductores es muy importante que el recubrimiento conductor de los patrones sea de la misma naturaleza y del mismo espesor que el de la muestra problema, para poder considerar despreciables los fenómenos de absorción y de número atómico del recubrimiento en ambos. Por lo tanto, es recomendable hacer simultáneamente el recubrimiento sobre patrones y probetas a analizar, siempre que sea posible.

## Referencias

- (18.1) B. L. Gabriel: *SEM: A User Manual for Materials Science*. ASM, Metal's Park, Ohio 44073 (1985), 154.
- (18.2) D. M. Kerrick y col: *The Role of Carbon Film Thickness in Electron Microprobe Analysis*. Am. Miner, 58 (1973), 920-925
- (18.3) Echlin: *Sputter Coating Techniques for SEM*. ILTRI/SEM, p. 217.
- (18.4) A. Fukami: *Specimen Preparation Techniques for Electron Microscopy*. Jeol News (1967), 5-7.
- (18.5) J. J. Rose: *A Replication Technique for Scanning Electron Microscopy: Applications for Anthropologist*. Am. J. Phys. Anthr., 62 (1983), 255-261.
- (18.6) E.C. Scott: *Replica Production for Scanning Electron Microscopy: A Test of Materials Suitable for Use in Field Settings*. J. Microscopy, 125 (1982), 337-341.
- (18.7) Metals Handbook Ninth Edition, Volume 9: *Metallography and Microstructures*. ASM, Metals Park, Ohio 33073
- (18.8) A.G. King, A.G., y K. Fuchs: *Polishing Porous Materials*. J. Ame. Ceram. Soc., 50, 6 (1967), 328.
- (18.9) T.B. Massalski: *Binary Alloy Phase Diagrams*, vol. 2. ASM, Metals Park, Ohio 44073 (1986), 1863.