

Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido

Jaime Renau-Piqueras & Magdalena Faura.

Sección de Microscopía Electrónica.
Centro de Investigación. Hospital "La Fé".
Avda. Campanar, 21.
46009 VALENCIA.

1.-Introducción

La posibilidad de observar muestras íntegras y en sus tres dimensiones mediante la microscopía electrónica, fue hecha realidad con la aparición del microscopio electrónico de scanning (SEM) o de barrido, en el año 1965. Sin embargo, los conceptos básicos para este tipo de microscopía fueron propuestos por Knoll en 1935, tres años después de que Ruska y Knoll lo hicieran para el microscopio electrónico de transmisión (TEM). Mientras que en el desarrollo de este último se hicieron grandes y rápidos progresos hasta el punto de que en 1939 Siemens y Halske comercializaron el primer TEM, la microscopía de barrido tendría que esperar hasta que en 1965, la Cambridge Instrument Co. lanzase el primer SEM. Desde entonces hasta la fecha, este tipo de microscopía ha avanzado rápidamente constituyéndose en una técnica imprescindible en distintos tipos de estudio, tanto sobre material biológico como en el campo inorgánico.

Aunque los fundamentos teóricos del TEM y del SEM son similares, conviene recalcar cuales son los puntos principales comunes y que diferencian ambos sistemas, a saber:

TEM	SEM
Necesidad de alto vacío	Necesidad de alto vacío
Haz electrónico estático	Haz electrónico móvil
Haz electrónico no puntual	Haz electrónico puntual
Necesidad de secciones ultrafinas	Muestras íntegras

Electrones transmitidos
 Lente proyectora
 Pantalla en el interior de la columna
 Imagen en dos dimensiones
 Resolución de 0,5 nm
 Aumentos hasta 500.000
 Contraste químico de la muestra

Electrones secundarios
 Ausencia de lente proyectora
 Pantalla en tubo Brown
 Imagen tridimensional
 Resolución de 10 nm
 Aumentos hasta 140.000
 Contraste no químico

2.-Principios físicos del Microscopio Electrónico

2.1. Poder de resolución.

Un microscopio es un instrumento diseñado para hacer visibles objetos que el ojo no es capaz de distinguir. Cuando los rayos de luz emitidos por un punto pasan a través de una lente de apertura semiangular alfa, se forma una imagen no mayor que un punto pero cuya intensidad se manifiesta en forma del llamado disco de Airy (Fig.1). La distancia (D) entre los dos mínimos de dicho anillo situados a ambos lados del pico de máxima intensidad viene dada por la expresión:

$$\frac{1}{D} = \frac{2n \operatorname{sena} \alpha}{1,22 \lambda} \quad D = \frac{0,61 \lambda}{n \operatorname{sena} \alpha} \quad [1]$$

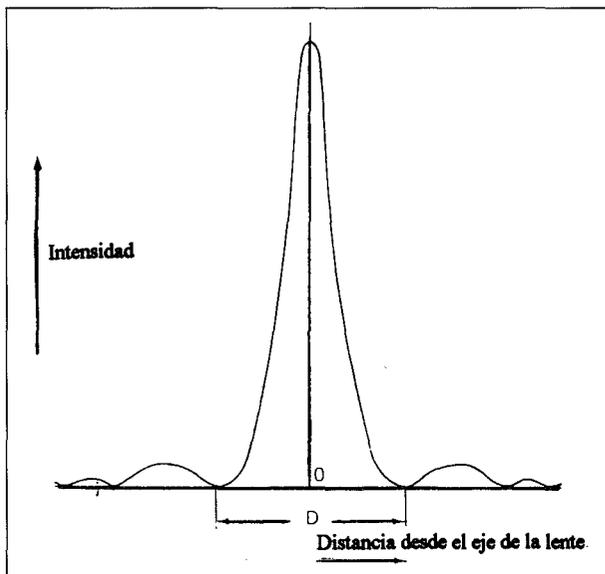


Figura 1.-Perfil de intensidad del disco Airy en un punto. En ordenadas se representa la intensidad de la imagen. En Abscisas, la distancia desde el eje de la lente. O: eje de la lente. D: diámetro del disco central de intensidad, dado por $D = 1.22 \text{ Lambda}/n \operatorname{sena} \alpha$.

donde λ es la longitud de onda de la luz, n el índice de refracción del material donde se encuentra el objeto y α la semiapertura numérica. Cuando dos puntos emisores se encuentran muy próximos (Fig.2) las intensidades de ambos en la imagen final se solapan. Así, la resolución de un sistema óptico se define como la distancia entre los máximos cuando la intensidad máxima de un punto coincide con el primer mínimo del otro punto. Como se puede deducir de la expresión [1], la resolución no depende de ninguna propiedad de la lente a excepción de α .

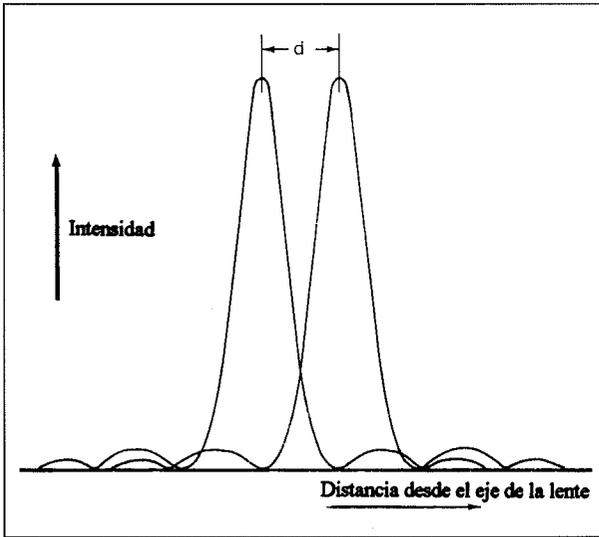


Figura 2.-Definición de resolución en términos de separación del disco de Airy. El máximo central de una imagen coincide con el primer mínimo de densidad de la imagen adyacente, $D=1.22 \lambda / n \text{sen} \alpha$.

En microscopía óptica, utilizando objetivo de inmersión, el valor de $n \cdot \text{sen} \alpha$ es aproximadamente de 1.4 y si se considera una λ de 50 nm el límite de resolución sería de 217.86 nm.

De Broglie (1924) demostró que un haz de electrones acelerados posee una longitud de onda asociada de:

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad [2]$$

donde h = constante de Plank, m = masa de la partícula y v = velocidad.

Si un haz de electrones se acelera mediante una diferencia de potencial $(ddp)=V$, la energía cinética que adquiere es:

$$E_c = \frac{1}{2} mv^2 = eV \quad [3]$$

de donde:

$$V = \left(\frac{2eV^{1/2}}{m} \right) mv = (2eVm)^{1/2} \quad [4]$$

por tanto, de [2] y [4]:

$$\lambda = \frac{h}{(2eVm)^{1/2}} \quad [5]$$

$$h = 6'624 \cdot 10^{-34} \text{ joules/s; } m = 9'10 \cdot 10^{-31} \text{ kg; } e = 1'60 \cdot 10^{-19} \text{ coul.}$$

O también

$$\lambda = 0,1 \left(\frac{150}{V} \right)^{1/2} \quad [6]$$

De donde se puede deducir que:

V	λ (nm)
60.000	0'005
80.000	0'0043
100.000	0'00387
200.000	0'00274

es decir, mediante la utilización de un haz de electrones acelerados es posible conseguir longitudes de onda, λ del orden de 10^5 veces menores que cuando se utiliza luz visible.

Sin embargo, en un EM el kV real suele ser algo superior al que indica el equipo:

$$V_{real} = V_0 [1 + eV_0/2mc^2] \quad [7]$$

donde e= carga del electrón (e^-), m= masa del e^- , c= velocidad de la luz

$$V_{real} = V_0 [1 + 0.978 \times 10^{-16} V_0] \quad [8]$$

de forma que

V_o (V)	V_r (V)
60.000	63520'8
80.000	86259'2
100.000	109780'0

Por último, indicar que el poder de resolución (δ_o) dependerá también de la aberración esférica de las lentes electromagnéticas (C_s), de forma que

$$\delta_o = BC_s^{0.25} \lambda^{0.75} \quad [9]$$

donde B es una constante cuyo valor se encuentra comprendido entre 0'43 y 0'56. Para 100 kV, $\delta_o < 0'19$ nm.

Otros parámetros que tienen importancia en un EM de transmisión, como son la distancia focal de las lentes (f), la profundidad de campo (D_o) o el brillo (β) no serán objeto de revisión para el caso del SEM.

3.-Características S.E.M.

El fundamento del SEM radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío de alrededor de 10^{-7} Torr. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas (condensadora, objetivo) (Fig.3) desde unos 25.000 - 50.000 nm hasta unos 10 nm; es decir, su diámetro va disminuyendo hasta hacerse casi puntual. Al mismo tiempo, la intensidad de corriente se disminuye desde unos 10^{-14} Å hasta unos 10^{-10} - 10^{-12} Å. Esta disminución en la intensidad implica una menor cantidad de electrones primarios ya que la intensidad inicial de 10^{-14} Å supone una emisión de $1015 \text{ e}^-/\text{seg}$, mientras que en la definitiva, de 10^{-12} Å, es de $6.106 \text{ e}^-/\text{seg}$.

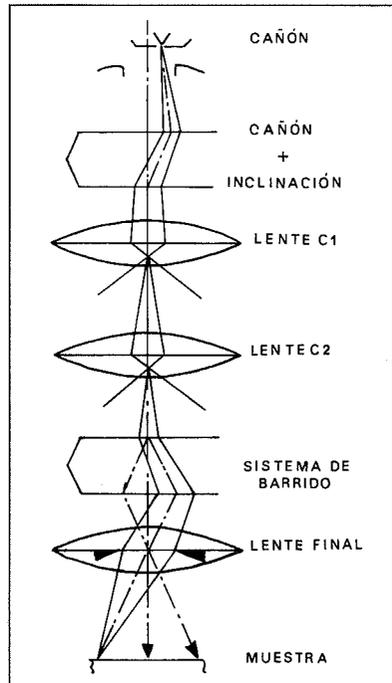


Figura 3.-Componentes de la "óptica" del SEM convencional.

El haz electrónico con estas últimas características, es decir puntual, es desplazado sobre toda la superficie de la muestra a modo de un pincel que iría barriendo la muestra con continuas idas y venidas. Esta motilidad del haz se consigue gracias a un sistema de bobinas de barrido situadas en la columna del instrumento (fig. 3 y 4).

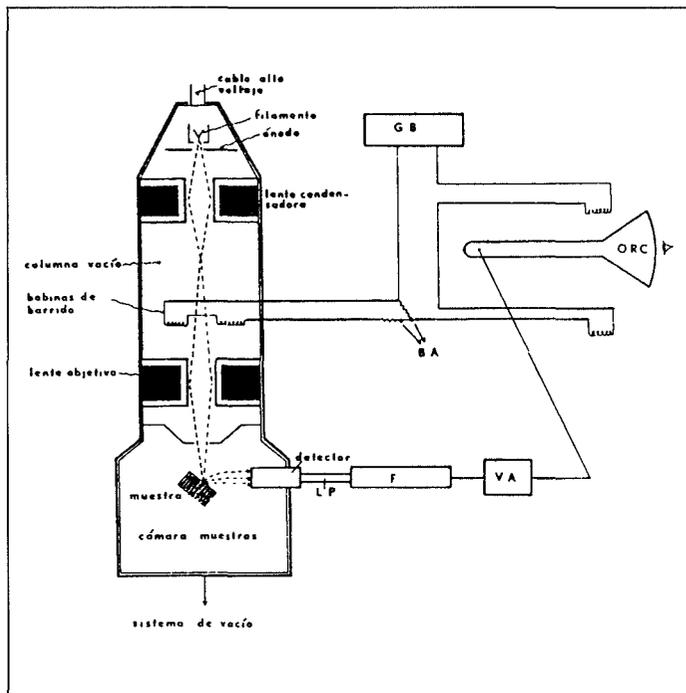


Figura 4.-Esquema del microscopio electrónico de barrido (SEM) en el que se muestran los diferentes componentes del mismo. LP: light pipe, F: fotomultiplicador, ORC: osciloscopio de rayos catódicos, GB: generador de barrido, BA: bobinas de amplificación.

En la interacción del haz electrónico con la superficie se producen e^- secundarios que, tras ser captados por un detector, son hechos incidir sobre un “scintilador”, donde cada e^- dará origen a varios fotones. Dichos fotones son dirigidos hasta un fotomultiplicador a través del cañón de luz y, ya en aquél, cada fotón dará origen a un fotoelectrón que, a través de una serie de dinodos con diferencias de potencial crecientes produce, mediante un efecto en cascada, gran cantidad de e^- secundarios. En definitiva, lo que se ha conseguido ha sido una amplificación de la corriente debida a los e^- secundarios originales o, dicho de otro modo, una amplificación de la información sobre la muestra suministrada de dichos e^- .

Los e^- secundarios, finalmente, previo paso por un videoamplificador, son dirigidos hacia un tubo semejante a un osciloscopio de rayos catódicos (ORC) sobre cuya pantalla se producirá la imagen (fig.5).

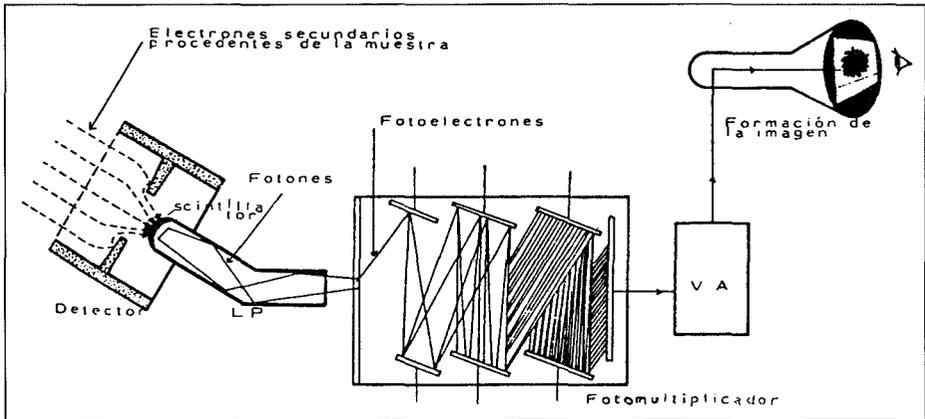


Figura 5.- Camino seguido por los electrones secundarios a partir de la muestra y formación de la imagen.

Concretando, se puede decir que una de las principales características de este instrumento es la existencia de una correspondencia biunívoca (punto a punto) establecida entre la muestra a examinar y la imagen formada, correspondencia que se establece al mismo tiempo, de forma que cubriría a la muestra en series de tiempo, quedando la imagen dividida en muchos elementos fotográficos los cuales serían captados por el sistema fotográfico instalado en el instrumento e integrados en una sola imagen que nos informa sobre la apariencia cúbica de material en estudio.

3.1. Tipos de señales emitidos por la muestra.

Existen señales que se producen por la interacción entre el haz electrónico y la muestra que son, en definitiva, las que darán lugar a la formación de la imagen. Estas señales pueden ser clasificadas en tres grupos con arreglo a su categoría (fig.6):

- a) Señales con carácter de ondas electromagnéticas, tales como rayos X y catodoluminiscencia.
- b) Señales compuestas por e^- , que incluyen e^- reflejados ("backscattered"), e^- secundarios, transmitidos y absorbidos.
- c) Solamente en el caso de especímenes semiconductores, señales de fuerza electromotriz (f.e.m.).

De estos tres tipos de señales solamente interesan aquellas compuestas por e^- y, en particular, las debidas a los e^- secundarios y a los reflejados ya que son éstos los que serán recogidas por el detector y, finalmente, expresadas en términos de brillos y oscuros sobre la pantalla del ORC.

La procedencia de los e^- varía; algunos e^- del haz pueden penetrar en la muestra perdiendo energía y distribuirse dentro de ella bajo diferentes ángulos.

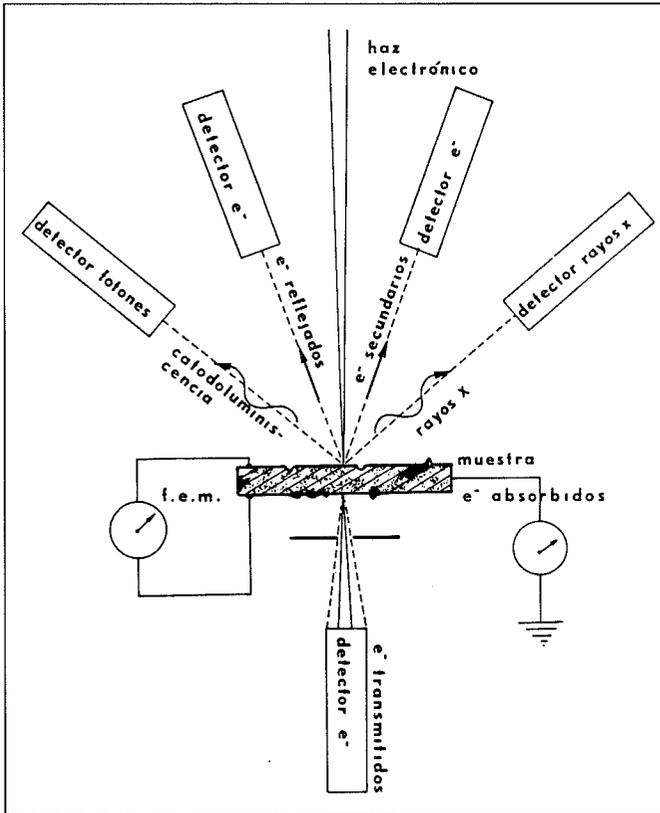


Figura 6.-Tipos de señales emitidos por la muestra en el SEM tras su interacción con el haz electrónico.

Una parte de éstos pueden, después, emerger siguiendo direcciones más o menos opuestas a la del haz. Son los e^- reflejados (BE). Otros e^- primarios pueden bombardear orbitales electrónicos de átomos de la muestra, lo cuales liberarían e^- . Éstos serían los e^- secundarios (SE1), de menor energía que los reflejados. Los e^- reflejados pueden también incidir sobre átomos de la muestra induciendo la producción de e^- secundarios (SE2).

En cuanto al resto de señales compuestas por e^- , aquellas debidas a los absorbidos estarían compuestas por e^- primarios que, tras penetrar en la pieza, permanecerían en su interior, mientras que las debidas a los e^- transmitidos estarían compuestas por e^- capaces de atravesar la muestra -siempre que ésta sea lo bastante fina-. Este último tipo de e^- es el utilizado en el TEM.

Existe una correspondencia entre el volumen de la emisión y el número atómico promedio (Z) de la muestra. A menor Z y mayor energía del haz, más penetran los e^- primarios y viceversa. Teniendo en cuenta esto, así como los resultados que indican que la profundidad desde donde pueden ser emitidas estas señales es

menor de 50 nm para los e^- secundarios, de 100 nm a 1 μm para los reflejados y de 500 nm a 5 μm para las radiaciones X, es lógico pensar en la necesidad de recubrir la superficie a examinar con un elemento metálico de Z elevado, que sea buen conductor, pueda emitir gran número de e^- y que, además, sea inoxidable, ya que los elementos biológicos (C, N, H, O, P, S, etc.) tienen un Z bajo y no resultan buenos conductores. En la fig. 7 se representa el volumen relativo de la emisión de cada tipo de señales de una muestra sin recubrir.

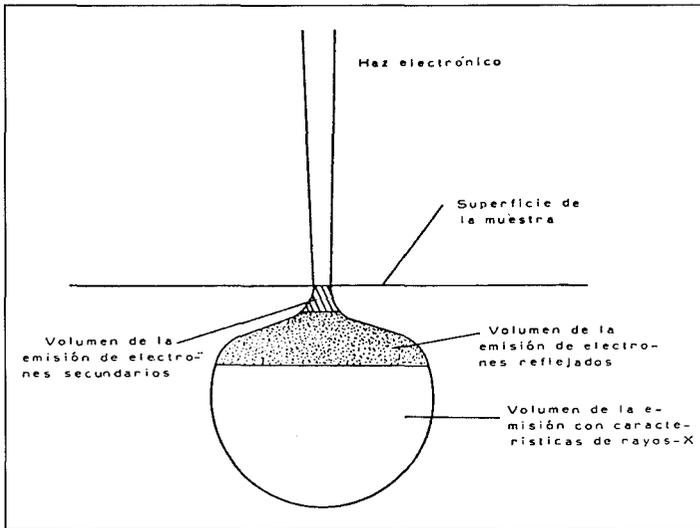


Figura 7.-Volumen relativo de los diferentes tipos de señales procedentes de una muestra que no ha sido previamente recubierta con un metal de Z elevado.

3.2. Detectores en SEM.

El detector en el SEM constituye el puente entre el haz electrónico y la pantalla donde las interacciones del haz con la muestra dan la información deseada. En principio, un detector debe satisfacer los siguientes requerimientos:

1) *Alta sensibilidad.* La señal típica que debe ser recogida se encuentra entre 1 pA (10^{-12}) y 1 nA (10^{-9}), equivalente a 10^6 - 10^9 e^- por segundo. Cada pixel en la imagen formada representa la detección de solamente 10-1.000 e^- .

2) *Alta frecuencia.* El detector debe ser capaz de responder a cambios arbitrarios en la intensidad de señal, que ocurren en función de la velocidad de barrido. Para observaciones normales, donde la formación del pixel es del orden de 10^5 por segundo, el detector requiere una frecuencia de alrededor de 1 MHz, aunque para registro fotográfico se puede trabajar con 100 kHz. Para la formación de la imagen de TV, la frecuencia debe ser superior a 30 MHz.

3) *Amplitud dinámica.* Para una serie de condiciones dadas, la señal a ser detectada puede variar entre dos puntos en magnitudes por un factor de 100:1 o

más. El detector debe ser capaz de trabajar en este rango sin pérdida de linealidad.

4) *Eficiencia*. La señal recogida es más débil en unas zonas de la muestra que en otras. La eficiencia del detector constituye el factor limitante del sistema y, por tanto, de la calidad final de la imagen.

5) *Tamaño físico pequeño*. Para trabajar en alta resolución la distancia de trabajo debe ser muy pequeña, lo que puede condicionar el tipo de detector a utilizar (sería necesario cambiar el detector en función de la distancia).

6) *Características de la cámara*. En la mayor parte de los SEMs, la cámara del portamuestras se suele abrir con frecuencia para cambiar la muestra. Los detectores deben ser estables a los cambios vacío-aire, oscuridad-luz.

3.3. Detectores de SE.

Como se ha mencionado, los SE se producen como resultado de colisiones entre los electrones incidentes y los átomos de la muestra. Los SE poseen energías entre 0 y 50 eV, siendo la más probable de 4 eV. El número de BE y SE producido en condiciones normales suele ser similar, aunque la mayoría de las imágenes que se utilizan corresponden a la de SE. La principal razón de esta diferencia estriba en el procedimiento de detección de ambos tipos de electrones. Tanto los SE como los BE son emitidos desde la superficie de la muestra con una distribución cosinusoidal (fig.8). Puesto que los SE poseen poca energía, su detección se realiza de forma eficaz mediante la aplicación de un campo magnético o eléctrico capaz de deflectar los electrones hacia el colector. Los BE, por el contrario, al poseer mayor energía son más difíciles de deflectar.

El detector de SE más común fue descrito por Everhartz y Thornley (1960). Dicho detector puede ser configurado de distintas formas según su finalidad. Para

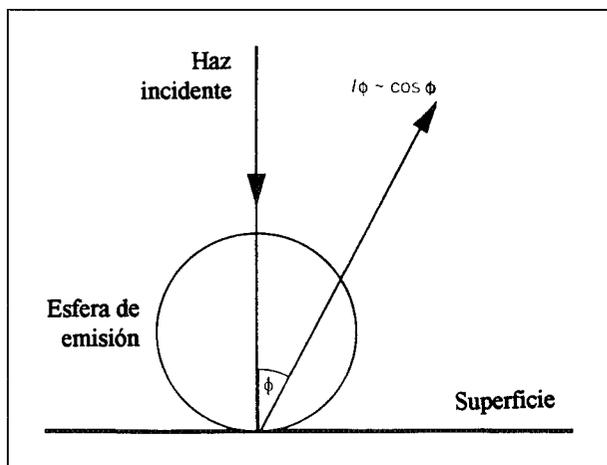


Figura 8.-Ley de distribución del coseno para la emisión de SE y BE desde una superficie tras una incidencia normal del haz.

SEM convencional se sitúa en la cámara portamuestras, por debajo de las lentes, a unos 10^{-20} mm de la muestra. En esta posición, el campo de +10 kV del “scintillator” puede deflectar o distorsionar el haz incidente, particularmente cuando se trabaja con un haz de baja energía. Para evitar esto, el “scintillator” se rodea por una caja de Faraday o una rejilla metálica con un potencial de +200 V con respecto a la muestra. Esto produce un campo de unos 100 V/cm en la muestra, suficiente para captar el 60% de la producción secundaria total generada por la incidencia normal del haz. Las desventajas de esta configuración radican en la posición asimétrica del detector, que puede dar como resultado un artefacto de iluminación, especialmente a bajos aumentos. Igualmente, esta construcción puede inducir a la producción de SE por la incidencia de los BE sobre la pieza polar de las lentes (SE3) (fig.9 y 10).

Un sistema alternativo utiliza el campo magnético de la lente para recoger la señal. Este sistema permite eliminar parte de las anteriores dificultades y mejora la señal cuando se trabaja en alta resolución (fig.11).

3.4. Efecto de iluminación y de contraste.

Conviene distinguir entre el efecto de iluminación y el de contraste que se observan en una imagen del SEM, así como entre el contraste en la imagen debida a e^- reflejados y en el de la debida a e^- secundarios.

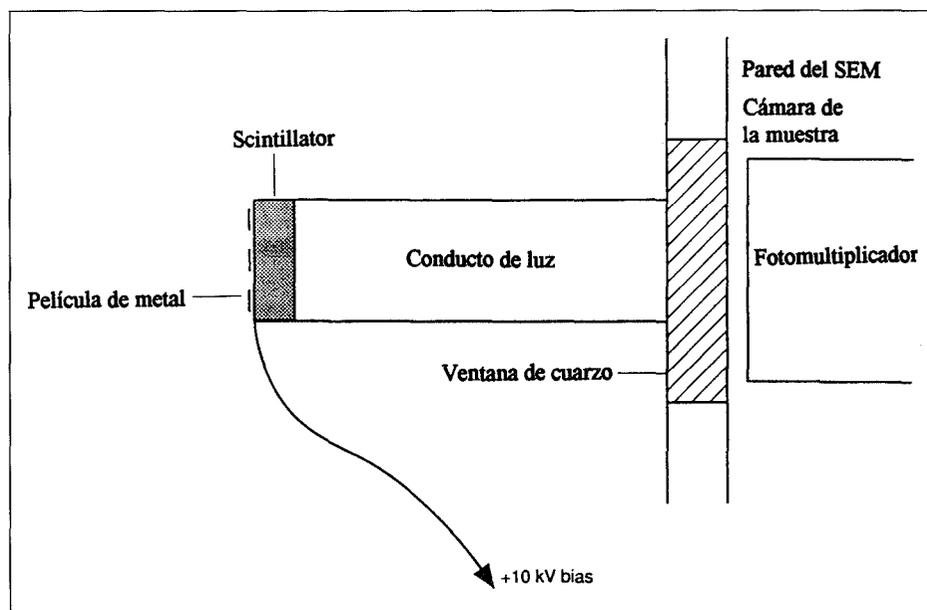


Figura 9.- Detector de Everhart-Thornley para SE.

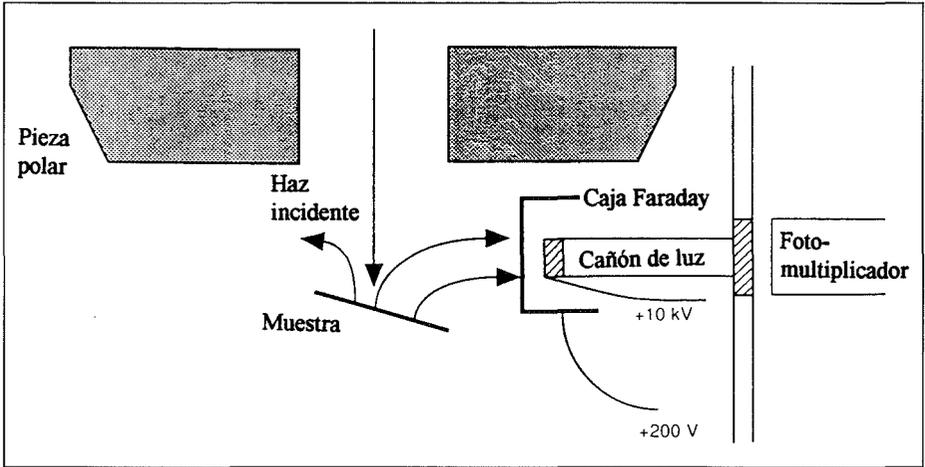


Figura 10.-Detector de Everhart-Thornley para SE instalado en la cámara portamuestras del SEM.

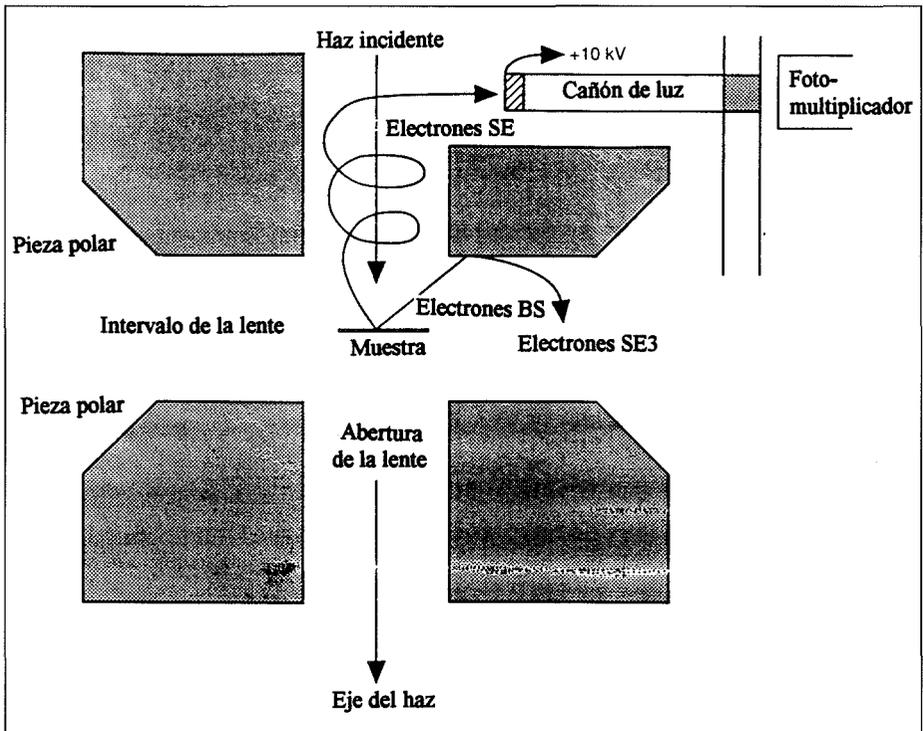


Figura 11.-Detector de Everhart-Thornley para SE en su configuración de alta resolución.

Para una correcta interpretación de la imagen es necesario tener presente cuál es la posición del foco luminoso y cuál es la del ojo observador. Si consideramos que el haz irradia la superficie expuesta y que los e^- procedentes de ésta son captados por un detector es correcto suponer, para aclarar estos conceptos, que el haz sería el camino seguido por la luz cuyo origen o foco es el filamento, y que el detector equivaldría, dentro de esta suposición, al ojo del observador, capaz de captar las señales que parten de la superficie de la muestra. Pero esto sería erróneo si no se considerase el tipo de e^- emitidos por las muestras. La mayor parte de los e^- secundarios procedentes de la muestra son captados por el detector tras seguir trayectorias curvas. Por tanto, estos e^- darán como resultado una imagen que aparecería como iluminada desde todos los ángulos. En cambio, debido a que los e^- reflejados siguen trayectorias rectilíneas hasta llegar al detector, sólo unos pocos serán recogidos y el efecto de iluminación en este caso sería como si la muestra hubiera sido iluminada solamente desde un punto.

Finalmente, en lo que se refiere al contraste ya se ha indicado que en SEM no es químico, no se utilizan sales de metales pesados (citrato de plomo, acetato de uranilo, ...) para contrastar las muestras como ocurre en el TEM. En el SEM, los factores que pueden influir en el contraste que presenta la imagen son muchos y sus orígenes son también variados. Aquí solamente se distinguirá entre el contraste de la imagen debida a e^- reflejados y el de la formada por e^- secundarios:

a) *Contraste de la imagen debida a e^- reflejados.* Dos son los factores primordiales que intervienen en este caso. En primer lugar, el Z promedio de la muestra y en segundo, el ángulo de incidencia del haz electrónico con la superficie o, dicho de otro modo, la irregularidad de la superficie.

b) *Contraste de la imagen producida por e^- secundarios.* En este caso son muchos más los factores a tener en cuenta, y de ellos los principales son los siguientes: primero, la topografía de la muestra, es decir, la irregularidad de la superficie expuesta al barrido del haz; segundo, el Z promedio de la muestra; tercero, "contaminación" debida a la presencia de e^- reflejados. Es decir, siempre existe un pequeño número de e^- reflejados o de e^- secundarios con información de reflejados. Por ejemplo, un e^- reflejado puede, al salir de la muestra, incidir sobre un átomo de la misma induciendo a éste a una emisión de e^- secundarios. [El tipo de señal contenido en este e^- no puede considerarse como de e^- secundario puro]. Cuarto, cargas eléctricas distribuidas irregularmente en la superficie del material que dificultarán (si son positivas) o facilitarán (si son negativas) la emisión de e^- secundarios por parte de la muestra.

4.- Poder de resolución en SEM.

Los SEM actuales, equipados con emisión de campo y lentes de inversión de alta excitación, son capaces de generar un "probe" con un diámetro de pocos nanómetros. La resolución de la imagen SE, está determinada por dos factores: la distribución espacial de los SE generados y la subsecuente salida de estos electro-

nes hacia la superficie. Se ha mencionado la existencia de dos tipos de SE: los SE1 que se generan por el haz electrónico incidente y los SE2 que se originan a partir de los BE. Mientras que la señal SE1 se genera dentro de un círculo de pocos nm formado alrededor del punto de impacto del haz, la señal SE2 se produce dentro del volumen total de interacción del haz con la muestra. Sin embargo, cuando el SEM trabaja con suficiente energía, la contribución de los SE2 es independiente de la posición del haz incidente y la imagen se forma de la variación espacial de los SE1. Mientras que la visibilidad (o contraste) de esta variación se puede ver afectada por la presencia de la señal de SE2, su resolución espacial no se ve afectada.

En estas condiciones la resolución espacial está determinada por la capacidad de salida de los SE. Un concepto importante es que cada eje de un detalle en una imagen producida por los SE es "brillante" debido a que los SE tienen dos superficies, a través de las cuales se liberan (fig.12). El ancho de esta región brillante es del orden del diámetro del "probe" (aproximadamente 1 nm) más la distancia

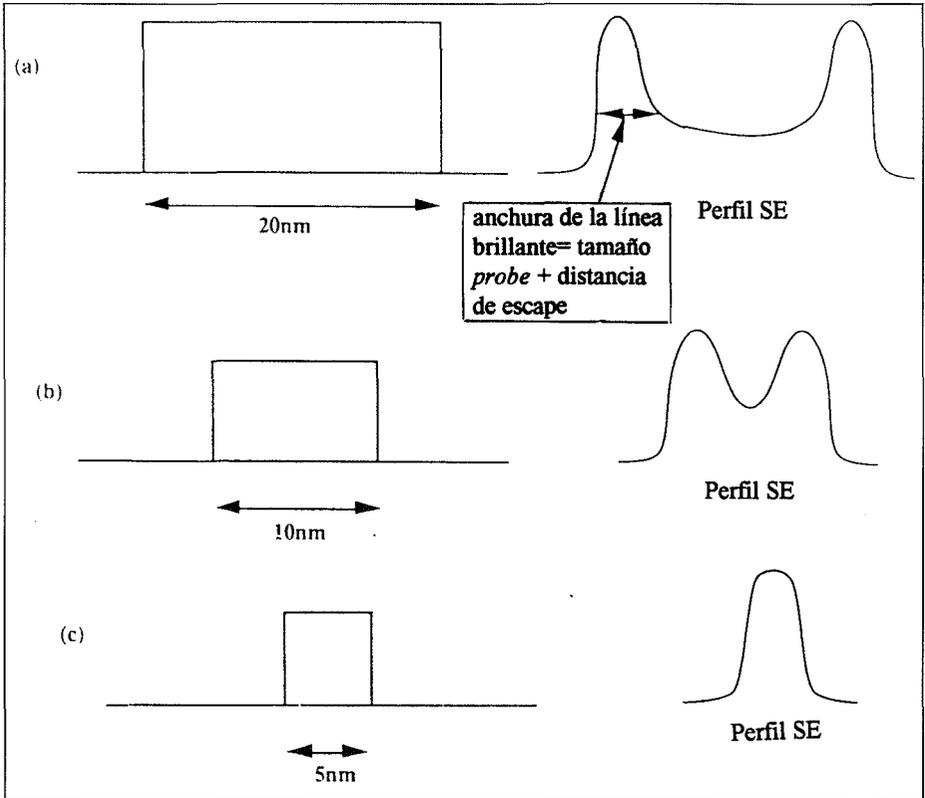


Figura 12.-Origen del límite "clásico" de resolución en la imagen por SE.

media de escape de los SE (normalmente 3-4 nm). Si dicha región es bastante ancha (aprox. 20 nm) es posible resolver el detalle de la imagen (fig.12). Sin embargo, cuando las dos zonas de escape de los SE se van aproximando, la capacidad de resolver los detalles se va perdiendo, de forma que si el detalle está por debajo de 5 nm ambas zonas se solapan y no es posible distinguirlo. Esta limitación puede resolverse cubriendo la muestra con una capa uniforme de metal (fig.13). En esta situación la magnitud de la señal SE depende del grosor de la capa metálica (fig.13) por lo que la utilización de film ultrafino durante la metalización es un factor importante para la obtención de una buena resolución. Así, en teoría, el recubrimiento homogéneo de la superficie con una monocapa de metal permitiría llegar a resoluciones del orden de 0'4 nm. Sin embargo, no resulta sencillo depositar una monocapa uniforme de metal sobre una superficie rugosa, produciéndose zonas donde el sombreado metálico puede variar en grosor. En segundo lugar, el transporte de la muestra desde el metalizador hasta el SEM puede hacer que se oxide el film, parcial o totalmente, produciéndose como consecuencia variaciones en la producción local de SE. Por último, la emisión de SE se puede ver afectada en gran manera por la existencia de "micro-patches", que se producen por diferencias de tiempo en el examen de la muestra. Por ejemplo, una

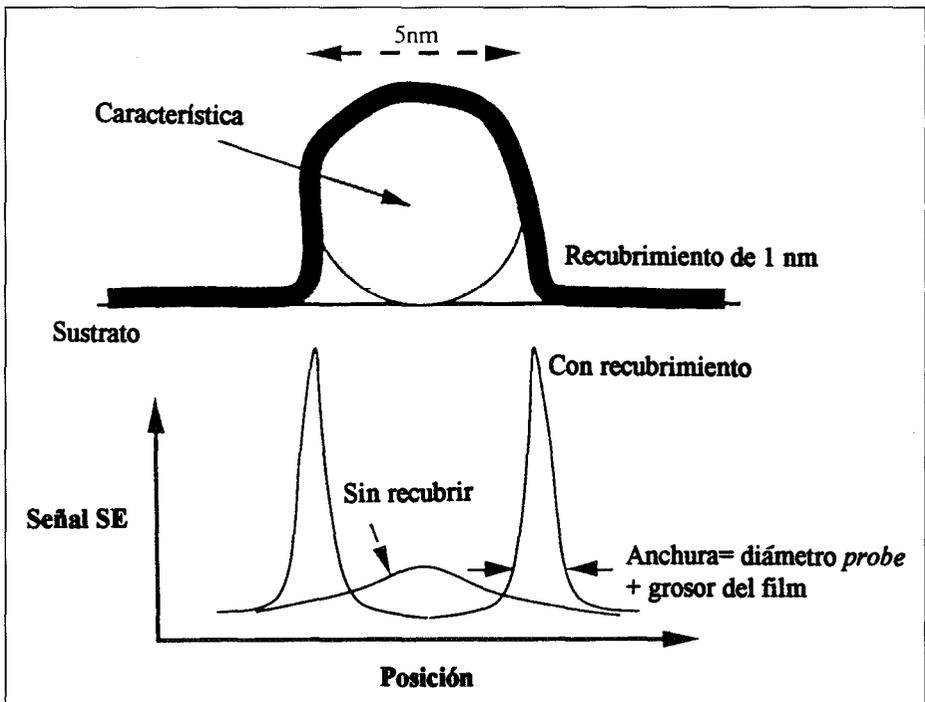


Figura 13.-Utilización de recubrimiento metálico para mejorar el límite de resolución en el SEM.

diferencia de potencial de 0'1V entre dos puntos distantes en 5 nm produce un campo superior a 106 V/cm, lo que modifica drásticamente el proceso normal de captura de los SE.

Por último, señalar que el desarrollo de los SEM de bajo voltaje (LVSEM) y alta resolución, así como de las técnicas de crío-SEM, podrían permitir mejorar considerablemente la resolución del SEM.

5.- Artefactos.

Cuando se trabaja en SEM es fácil encontrarse con una serie de posibles artefactos que darán como resultado una alteración de la imagen final. Estos artefactos pueden ser originados bien por los métodos de preparación de las muestras, bien por las características del equipo, o finalmente, por el manejo del mismo. En este apartado se pretende revisar brevemente las principales fuentes de artefactos y las consecuencias de las mismas sobre la imagen.

5.1-Artefactos debidos a la preparación de la muestra.

Durante el proceso de preparación de las muestras para SEM existen varios pasos particularmente críticos que es necesario controlar o conocer a la hora de la posterior obtención e interpretación de las imágenes. El primero de ellos es la temperatura de lavado y de fijación, sobre todo cuando se pretende analizar estructuras como son los microvilli, capaces de variar en número y tamaño. En estas circunstancias es conveniente iniciar la fijación a 37°C, y, al cabo de unos 15 min, continuarla a 4°C. Durante este proceso tiene especial importancia la presión osmótica de los tampones y fijadores, que debe ser de 270-300 mOsm. Variaciones en este parámetro conducen a graves alteraciones tanto en la arquitectura de superficie como en el volumen de las muestras.

Un tercer aspecto es el que corresponde al secado de la muestra. Dicho secado, que se produce ineditamente realizada la deshidratación y antes que el recubrimiento metálico convencional puede realizarse según varios procedimientos. El primero, conocido como secado al aire ("air drying"), producen roturas en la superficie a observar así como el colapsamiento de distintas estructuras, por lo que su uso queda muy restringido. El segundo y más universal es el secado por punto crítico ("critical point drying") donde el fluido utilizado durante el último paso de la deshidratación es sustituido por otro (p.e. CO₂) que puede ser transformado, bajo determinadas condiciones de temperatura y presión y de una manera muy paulatina, de líquido a gas. En el caso del CO₂ dicho secado se produce a una temperatura de 31'04°C y P= 73 Atm. Sin embargo, debido a la presión a que se someten las muestras, se suelen producir procesos de miniaturización de la misma que pueden ser del orden del 55% del diámetro original. Esta reducción del tamaño, no obstante, no altera la morfología original de la muestra. Un tercer procedimiento es el conocido como "freeze drying" consistente en la sublimación

del hielo en vapor de agua en una muestra recién congelada. Mientras que este procedimiento respeta en gran medida las dimensiones originales, puede introducir alteraciones de la superficie a examinar, producidas por los cristales de hielo formados.

Por último, el sombreado metálico, al que se debe someter las muestras para su examen convencional, es fuente de distintos tipos de artefactos tal como se ha mencionado con anterioridad (ver aptdo.4). El artefacto más frecuente es el de recubrimiento irregular de la superficie, que se traduce en distintas intensidades de emisión de SE1 y BE y, por tanto, en zonas de brillo o de carga que dificultan en gran medida la observación de la muestra. Una alternativa al sombreado mediante evaporadores consiste en el recubrimiento químico, que se realiza tras la fijación y utilizando como agente el OsO_4 . Este sombreado se basa en la propiedad del Os de ser, además de fijador, un metal capaz de emitir SE1.

Entre las principales causas de artefactos debidas a la manipulación del equipo, destacan la distancia de trabajo y apertura, la distorsión de la imagen debida a la inclinación de la muestra (“tilt”), el efecto de contraste por el kV y la contaminación de la columna. Todas estas variables inciden fundamentalmente en tres aspectos: definición de la imagen, profundidad de campo y contraste. Sin embargo, la causa más frecuente es el astigmatismo, defecto del campo magnético que da como resultado distintas intensidades en las dos direcciones que conforman un ángulo recto, de forma que, mientras una dirección se ve bien definida, la contraria (90°) aparece desenfocada. El astigmatismo en el SEM suele producirse con frecuencia aunque no es difícil corregirlo mediante la utilización de un campo de lente cilíndrica o compensadora. En todos los casos citados debidos al manejo del equipo los artefactos son corregibles, por lo que es importante, antes del examen de una muestra, establecer las condiciones de trabajo óptimas (kV, distancia de trabajo, aperturas, “tilting”, etc.).

6.- Aplicaciones del SEM.

Además del examen de muestras convencionalmente preparadas para el estudio de su superficie (SEM convencional), la microscopía de barrido tiene en la actualidad otras aplicaciones que resultan de gran interés tanto en el campo biológico como en el de materiales. La primera aplicación en importancia consiste en la posibilidad de hacer análisis cuantitativos de los componentes de la muestra, lo que se realiza mediante el análisis de los rayos X emitidos por la muestra tras su irradiación con el haz electrónico. Una segunda aplicación en el campo biológico es el análisis inmunocitoquímico de los componentes de la superficie de la muestra. Esta posibilidad de reciente desarrollo se basa en el mismo principio de la técnica inmunocitoquímica con oro coloidal. Es decir, las muestras, fijadas o no, se incuban con un primer anticuerpo capaz de reconocer algún tipo de antígeno de superficie, tras lo cual se procede a una segunda incubación con un segundo anticuerpo conjugado con partículas de oro coloidal. Mediante las señales BE se

puede visualizar las partículas de oro en los lugares de reacción y, mediante las señales de SE1, se analiza la topografía de la superficie. Esta técnica se está utilizando con bastante éxito para el análisis de los antígenos de superficie linfocitarios, así como para los lugares de unión del virus del SIDA.

Por último, existe la posibilidad de congelar la muestra, fracturarla mecánicamente y, tras los procesos de preparación habituales, examinar el interior de las células. Esta técnica, aunque difícil, permite el examen tridimensional de los componentes intracelulares.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-AUTRATA, R. & HENJA, J. (1991). Detectors for low voltage SEM. *Scanning*. 13: 275-288.
- 2.-BRUNK, U., COLLINS, V.P. & ARRO, E. (1981). The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells for SEM. *J Microscopy* 123: 121-131.
- 3.-CUEVAS, L., HERRERA, M.I. & SANTA MARÍA, I. (1991). Métodos de microscopía electrónica de barrido. In: *Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica*. (Durfort M., Vilaró S., Renau J. & Serratosa J., eds.). pp: 253-267. Barcelona, Universitat de Barcelona.
- 4.-DE HARVEN, E. & SOLIGO, D. (1989). Backscattered electron imaging of the colloidal gold marker on cell surfaces. In: *Colloidal Gold. Principles, methods and applications*. (Hayat M.A. ed.). Vol 1, pp: 229-249. San Diego, Academic Press.
- 5.-EVERHART, T.E. & THORNLEY, R.F. (1960). Wide-band detector for microampere low-energy electron currents. *J. Sci. Instruments*. 37: 246-248.
- 6.-HAYAT, M.A. (ed.) (1974). *Principles and techniques of scanning electron microscopy*. Vols. 1 y 2. New York, Van Nostrand Reinhold.
- 7.-HODGES, G.M. & CARR, K.E. (1983). *Biomedical research applications of scanning electron microscopy*. Vol 3. London, Academic Press.
- 8.-JOY, D.C. (1992). Resolution limit of the SEM. In: *Electron Microscopy. EUREM 92* (Megías-Megías L., Rodríguez-Gracia M.I., Rios A., & Arias JM). Vol.3. pp: 735-739. Granada, Universidad de Granada.
- 9.-KIMOTO, S. (1972). *The scanning electron microscopy as a system*.
- 10.-ZACH, H.M. & SCHAFFER, G. (1992). A high resolution low-voltage scanning electron microscope for biological applications. In: *Electron Microscopy. EUREM 92* (Megías-Megías L., Rodríguez-Gracia M.I., Rios A., & Arias JM). Vol.3. pp: 729- 733. Granada, Universidad de Granada. *Jeol News* 10e.
- 11.-MULLER, M. & HERMANN, R. (1992). High resolution SEM-immunocytochemistry. In: *Electron Microscopy. EUREM 92* (Megías-Megías L., Rodríguez-Gracia M.I., Rios A., & Arias JM). Vol.3. pp: 741-747. Granada, Universidad de Granada.
- 12.-MURPHY, J.A. & ROOMANS, G.M. (1980). Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Chicago, SEM Inc., AMF O'Hare.
- 13.-RENAU-PIQUERAS, J. & KNECHT, E. (1979). Freeze-fracture and scanning electron microscopy of lymphocyte: Effect of different preparatory techniques on cell surface morphology. *Israel J. Med. Sci.* 15: 660-667.
- 14.-RENAU-PIQUERAS, J., MIGUEL, A. & KNECHT, E. (1980). Effects of preparatory techniques on the fine structure of human peripheral blood lymphocytes. II. Effect of glutaraldehyde osmolarity. *Mikroskopie*. 36: 65-80.

- 15.-SCHNEIDER, G.B., POCKWINSE, S.M. & BILLINGS-GAGLIARDI, S. (1978). Morphological changes in isolated lymphocytes during preparation for SEM: A comparative TEM/SEM study of freeze drying and critical-point drying. SEM, Vol II. pp: 77-84. Chicago. SEM Inc., AMF O'Hare.
- 16.-TANAKA, K. (1980). Scanning electron microscopy of intracellular structures. Int. Rev. Cytol. 68: 97-125.
- 17.-ZACH, H.M. & SCHAFFER, G. (1992). A high resolution low-voltage scanning electron microscope for biological applications. In: Electron Microscopy. EUREM 92 (Megías-Megías L., Rodríguez-Gracia M.I., Rios A., & Arias JM). Vol.3. pp: 729-733. Granada, Universidad de Granada.