

## TÉCNICAS INSTRUMENTALES: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

María García

Servicio de Microscopía de la Universidad de Murcia

La microscopía electrónica es una técnica que permite ver estructuras que no pueden ser vistas con el microscopio óptico tradicional y esto es gracias a unos microscopios especiales cuya fuente de emisión son partículas de electrones que permiten aumentar la resolución. Con esta técnica podemos estudiar muestras muy variadas, tanto respecto a la morfología externa de plantas, animales, microorganismos y virus, como los detalles ultraestructurales internos de estos organismos.

La microscopía electrónica tuvo sus comienzos a principio de los años 30. Ernest Ruska desarrolló un sistema de electroimanes que permitía concentrar y enfocar un haz de electrones de manera análoga a la acción que ejerce una lente de vidrio sobre un haz de luz.

Este descubrimiento denominado más tarde “lentes electromagnéticas” permitió que E. Ruska construyera el primer microscopio electrónico de transmisión en 1931, mientras que a Von Ardenne se le atribuye el primer microscopio electrónico de barrido que se construyó en 1938. Así se dividieron en dos las técnicas de microscopía electrónica: la microscopía electrónica de transmisión y la microscopía electrónica de barrido que, si bien tienen un mismo fundamento basado en una fuente de iluminación común, la información que nos dan sobre la muestra es diferente. Paralelamente se desarrolló otra metodología que permitió el análisis de una muestra, mediante el patrón de dispersión de los Rayos X generados por la interacción del haz de electrones sobre la muestra.

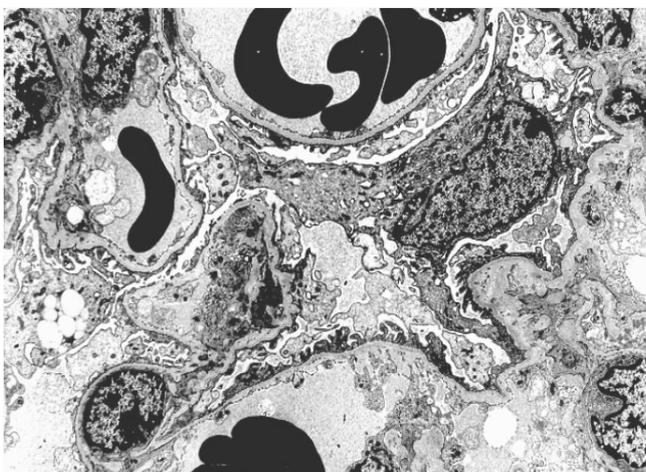


Figura 1. Corte ultrafino de glomérulo de riñón, 70 nm, para microscopía de transmisión, 10.000x.

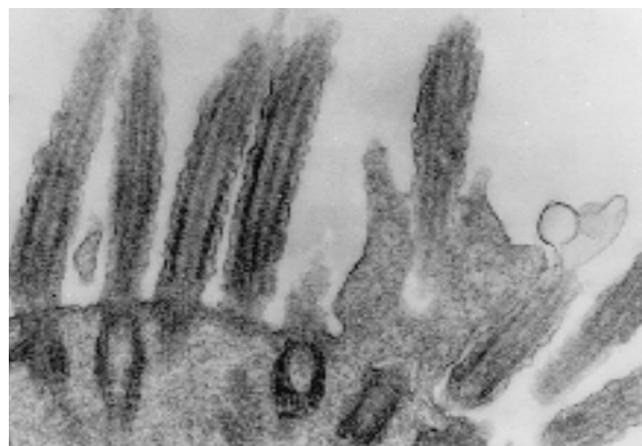


Figura 2. Corte ultrafino longitudinal de Cilios, 70 nm, para microscopía de transmisión, 10.000x.

El microscopio electrónico de transmisión, al igual que ocurre con el microscopio óptico de luz, forma una imagen con el haz de energía que atraviesa la muestra, que en este caso se trata de electrones acelerados a muy alto voltaje. En la técnica de microscopía electrónica, para que los electrones atraviesen la muestra sin ser destruida por calentamiento, debe seguirse un proceso previo que es similar al que se emplea para obtener cortes histológicos para el microscopio de luz. Los cortes deben tener un grosor máximo de 100 nm (1000 XX), aproximadamente 50 veces más finos que un corte histológico observado al microscopio de luz que normalmente es de 500nm ( $0,5\mu m$ ). Además los cortes deben contrastarse, lo que usualmente se llama “tinción” en microscopía de luz, aunque ese término, que se refiere a color, no se utiliza sino que se habla de “contraste”. Consiste en una impregnación de tejido con sales de metales pesados, como acetato de uranilo y citrato de plomo que aumenta la electronodensidad en el sitio en que se produce la deposición. Esto hace que algunas zonas aparezcan oscuras o negras en la pantalla, lo que contrasta con lo claro de las zonas no impregnadas con metales.

El microscopio electrónico de barrido se puede explicar de una forma muy sencilla, pues se envía un haz de electrones sobre una muestra y mediante un detector adecuado se registra el resultado de esta interacción, para ello los electrones emergen de la superficie; y entre estos están los electrones secundarios que son arrancados de los orbitales de átomos de alto número atómico y esto hace que se generen las imágenes con carácter tridimensional, que caracterizan a la microscopía electrónica de barrido. Al generar estas imágenes el haz de electrones debe desplazarse sobre la superficie de la muestra de un lado a otro, haciendo un barrido de la superficie.

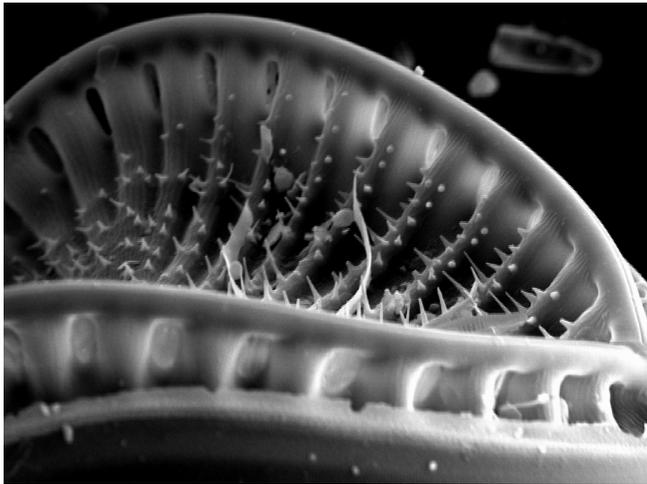


Figura 3. *Campylodiscus hibernicus*, una entre las muchas especies de diatomeas, algas unicelulares de formas y ornamentación siempre fascinantes. Muestra recubierta con oro y observada con electrones secundarios.

Para el estudio de muestras en microscopía electrónica de barrido han de tenerse en cuenta unas consideraciones de tipo general, tales como el tamaño de la muestra, montaje, limpieza y recubrimiento. La muestra ha de tener un tamaño de acuerdo con el que admita la cámara de muestras del microscopio. Debe fijarse a un soporte metálico con un tipo de adhesivo que asegure un buen contacto eléctrico a tierra y evitar desplazamientos de la imagen que puedan perturbar la obtención de micrografías o el estudio de microanálisis según nuestro interés. Las pinturas de plata y grafito son los adhesivos que normalmente se

utilizan.

Las muestras no conductoras tales como plásticos, cerámicas, vidrios, tejidos, etc, se cargan durante la irradiación de los electrones, provocando la desviación del haz electrónico y como consecuencia de ello la imagen. La solución a esto es recubrir la muestra con una película conductora, de espesor comprendido entre 15 y 25 nm.

La elección del material con el que se va a recubrir la muestra depende fundamentalmente del estudio que se va a realizar. Así para la observación de imágenes de electrones secundarios el oro y el oropaladio son los materiales que dan mejor resultado pues al ser elementos pesados, producen mayor emisión. Cuando lo que se pretende es un estudio microanalítico es recomendable emplear carbono ya que el bajo número atómico de este elemento lo hace prácticamente transparente a los rayos X emitidos por la muestra.

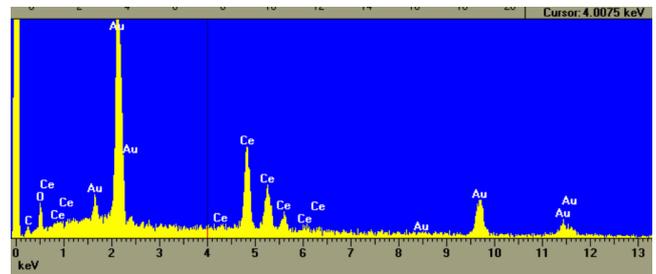


Figura 4. Espectro de un material recubierto con carbono para un estudio microanalítico.