

**FÍSICA E INGENIERÍA EN LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN  
APLICADA AL MET "JEOL JEM 1200-EX"**



**Julián Libardo Alvarez Solarte**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**INGENIERÍA FÍSICA**

**POPAYÁN**

**2014**

**FÍSICA E INGENEIRÍA EN LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN  
APLICADA AL MET "JEOL 1200-EXII TEM"**

**Julián Libardo Alvarez Solarte**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Ingeniero Físico**

**Directora**

**Dra. SONIA GAONA JURADO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**INGENIERÍA FÍSICA**

**POPAYÁN**

**2014**

Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

Directora \_\_\_\_\_  
Dra. Sonia Gaona Jurado

Jurado \_\_\_\_\_  
Dr. Jaime Oscar Diaz

Jurado \_\_\_\_\_  
Dr. José Luis Narváez

Popayán, 24 de Abril de 2014

Dedico este trabajo de grado, a mis padres Janeth Ximena Solarte Vargas y José Freddy Álvarez Pizo, a mis hermanos y demás familiares por quienes siento profundo amor y que han brindado a mi formación una invaluable ayuda y compañía.

A la memoria de mi abuelo Alejandro Solarte quién me dejó valiosas lecciones de vida.

A mis sobrinos Sara Sofía Álvarez Hurtado y Santiago Álvarez

A todas y cada una de las personas que de alguna u otra manera, contribuyeron a la culminación de mis estudios de pregrado ya que gracias a ellos y su compañía crecí como persona en este bonito proceso.

Julián Álvarez

## CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
<b>CAPÍTULO I: Una Introducción a la Microscopía</b>	<b>5</b>
1.1 El Microscopio Óptico	12
1.2 El Microscopio de Rayos X	15
1.3 Microscopia electrónica	18
1.3.1 El Microscopio Electrónico de Transmisión (MET)	19
1.3.2 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)	20
1.3.3 Microscopio Electrónico de transmisión-barrido (STEM)	22
1.3.4 Microscopio Electrónico Analítico	22
1.4 Microscópio de Barrido por Sonda (AFM)	23
<b>CAPÍTULO II: Óptica Electrónica</b>	<b>25</b>
2.1 Formación de la Imagen	27
2.2 Lentes Electrostáticas	32

2.2.3	Lentes Magnéticas	33
2.4	Formación de la imagen por lentes sin aberraciones.	36
2.5	Defectos de las Lentes	37
<b>CAPÍTULO III, El Jeol JEM 1200-EX, Parte I: Descripción General</b>		<b>41</b>
3.1	Descripción del MET JEOL, JEM 1200-EX (MET)	42
3.1.1	Configuración del MET	44
3.1.2	Funcionalidad	46
3.2	Descripción Técnica del MET JEOL JEM 1200-EX (MET)	51
3.3	Preparación de las muestras	56
3.6	Adquisición de la imagen	56
<b>CAPÍTULO IV, El Jeol JEM 1200-EX, Parte II: Bitácora de Mantenimiento</b>		<b>58</b>
4.1	Sistema de Vacío	60
4.2	Tanque de alto voltaje	61
4.3	Sistema de refrigeración	62

4.1.5	Componentes circuitales	63
4.1.6	Manipulación de Películas Fotográficas	63
4.6	Funcionamiento y calibración	64
<b>CAPÍTULO V: OTROS MICROSCOPIOS ELECTRÓNICOS</b>		<b>66</b>
5.1	Microscopio de barrido por Sonda, Laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional sede Manizales	67
5.2	Microscopio Electrónico de Barrido, Laboratorio de Microscopía de la Universidad Nacional sede Medellín	68
5.3	Microscopio Electrónico de transmisión Laboratorio de Microscopía de la Universidad Nacional, sede Palmira	70
<b>Conclusiones y Recomendaciones</b>		<b>72</b>
<b>Referencias y Bibliografía</b>		<b>74</b>
<b>Apéndice A1. Trabajos Futuros</b>		<b>75</b>
<b>Anexo A2. Presentación en eventos</b>		<b>76</b>

# Resumen

En este documento se consignó la información básica sobre la física e instrumentación involucrada en la microscopía electrónica de transmisión que se considera necesaria para que el lector se familiarice con los conceptos, con el fin de brindar apoyo bibliográfico a las actividades de operación, calibración y mantenimiento del (MET) JEOL. JEM 1200-EX de la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca, además de proponer nuevos usos para ampliar el campo de acción del instrumento mencionado teniendo en cuenta sus capacidades.

Durante el desarrollo de la pasantía en la Unidad de Microscopia Electrónica(UME)de la Universidad del Cauca se presentaron inconvenientes con el funcionamiento del MET que permitieron participar de forma directa en el trabajo de manipulación, corrección de daños, mantenimiento y operación, bajo la asesoría y acompañamiento de expertos en estos aspectos además se consultaron los manuales de funcionamiento y mantenimiento del MET.

La información aquí recopilada se basa en la experiencia adquirida y en la información consultada en los registros escritos de los procedimientos de manutención a los que el MET ha sido sometido desde su adquisición hasta la fecha.



# **INTRODUCCIÓN**

El interés por lo invisible es algo que parece permanente en el ser humano, el sentido de la visión nos brinda información morfológica (de forma) del entorno suficiente para permitirnos interactuar con él, sin embargo nuestros ojos tienen limitaciones y los objetos y estructuras a pequeña escala siguen siendo invisibles a simple vista; es donde se hace necesarios instrumentos ópticos que permitan obtener esta información morfológica, desde las lupas que se usan para reparación de los circuitos pequeños hasta los de interés científico como los microscopios que permiten obtener dicha información de objetos más pequeños como una célula.

Los microscopios ópticos usan fotones (luz visible) como fuente de iluminación para la muestra pero incluso ellos tienen limitaciones y para obtener parámetros morfológicos del orden de los nanómetros ( $10^{-9}$  m) es necesario un microscopio electrónico de transmisión (MET) que utiliza electrones en lugar de fotones para formar imágenes de objetos a dicha escala. Los MET permiten alcanzar ampliaciones miles de veces mayores a los microscopios ópticos, debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones.

La Unidad de Microscopía de la Universidad del Cauca cuenta con un microscopio electrónico de transmisión, MET, JEOL JEM 1200-EX) utilizado frecuentemente por algunos grupos de investigación de la universidad y por la Unidad de Patología del Hospital Universitario San José, para la adquisición de imágenes. Estas imágenes son soporte en las diferentes investigaciones ya que permiten determinar tanto información morfológica de nanopartículas como información ultraestructural de muestras orgánicas. Este microscopio fue adquirido en el año de 1989, lo que le da a la fecha alrededor de 24 años de uso continuo, que lo ha llevado a someterse a diferentes tipos de reparación producto de fallas de diferente índole, lo que ha creado una fuerte dependencia de personal, ya que en la región se cuenta con escaso personal capacitado en la tecnología de este tipo de instrumentación, dando lugar a la inutilización del equipo por largos períodos de tiempo.

Como es natural, durante su tiempo de uso el microscopio electrónico de transmisión de la universidad ha sufrido una serie de averías y consecuentes reparaciones, además, por su tiempo de existencia su tecnología es descontinuada y varios de sus componentes inasequibles. Sumado a lo anterior, el mantenimiento de equipos como este requiere de conocimientos especializados tanto en la física como en la ingeniería de su funcionamiento.

Con el desarrollo de la pasantía que se registra en este documento, se pretende dotar a la Unidad de Microscopia de material bibliográfico que contenga información básica sobre el Microscopio desde el punto de vista físico, instrumental y funcional que facilite las labores de operación y mantenimiento del mismo.

Para tal fin, el documento ha sido estructurado de tal forma que en el capítulo I se reporta información sobre las técnicas de microscopía, tanto óptica como electrónica. En el capítulo II se hace una breve descripción de la optoelectrónica de los microscopios electrónicos. Ya el capítulo III contiene información sobre las características del MET de la Universidad del Cauca, JEOL, JEM 1200-EX. Con el fin de consignar de forma estructurada los diferentes procedimientos, tanto para el buen uso del microscopio como para su mantenimiento, el capítulo IV contiene información técnica relevante. Finalmente, en el capítulo V se presentan las características de algunos microscopios de laboratorios del país que fueron visitados durante el tiempo de la pasantía.

Esta información fue adquirida gracias al apoyo y asesoría del ingeniero Jaime Oscar Díaz, quien hasta la fecha ha asumido la labor de mantenimiento del microscopio. Además, se contó con la valiosa colaboración de la especialista Lyda Patricia Mosquera, Coordinadora de la Unidad de Microscopía de la Universidad del Cauca.



# **CAPÍTULO I: Una Introducción a la Microscopía**

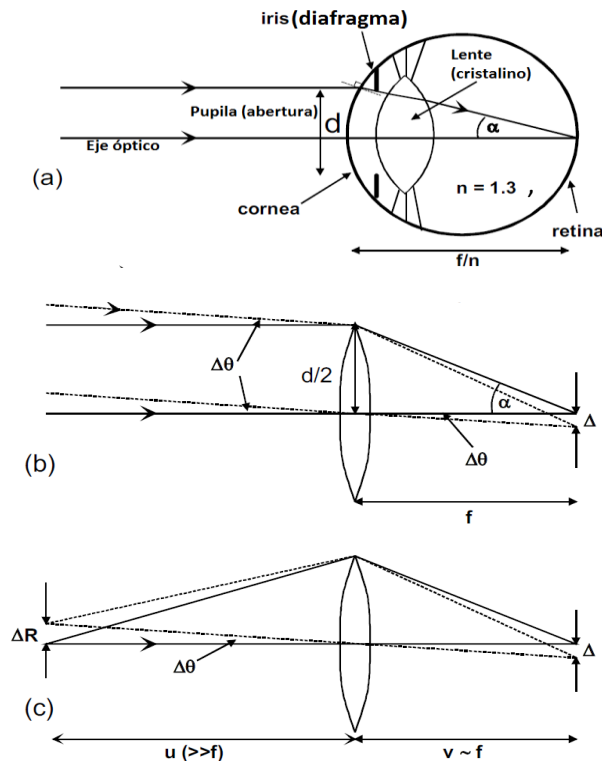
Los conceptos de la física están fuertemente determinados por lo que se concluye a partir de *observaciones*. Desde el punto de vista histórico, la palabra observación está muy ligada a la experiencia visual, cuyo dispositivo esencial, el ojo, es sensible a la radiación en el rango de la luz visible del espectro electromagnético, es decir, longitudes de onda en el rango comprendido entre 300 y 700 nm.

La luz que entra al globo ocular sufre su primera refracción al entrar en contacto con la cornea para luego atravesar un líquido llamado humor acuoso hasta llegar a un lente deformable llamado cristalino, para después atravesar un segundo líquido conocido como humor vítreo, formando finalmente una imagen en la retina. Los tres medios tienen índices de refracción sustancialmente diferentes al del aire ( $n \approx 1$ )<sup>[1]</sup>. Según la ley de Snell, el ángulo de refracción de la luz al atravesar la superficie de separación entre dos medios, depende de los índices de refracción de los medios. Como resultado, gran parte de los efectos de refracción de la luz incidente ocurren en la curvatura de la superficie del ojo, conocida como la córnea. Para enfocar objetos localizados a diferentes distancias, el ojo incorpora una lente elásticamente deformable (cristalino) de índice de refracción levemente alto ( $n \sim 1,44$ ) cuya forma y capacidad de enfoque son controlados por los músculos del ojo (músculos ciliares). Ambos, la córnea y las lentes del ojo, se comportan como un sistema de lentes de vidrio simple de distancia focal variable, formando una imagen real en la curvatura de la retina en la parte posterior del globo ocular, tal como se observa en la figura 1.1. La retina contiene células receptoras fotosensibles que mandan señales electroquímicas al cerebro, siendo que la magnitud de cada señal representa la intensidad local de la imagen.

Sin embargo, los procesos fotoquímicos en las células receptoras operan sobre un rango limitado de intensidades, por tanto el ojo controla la cantidad de luz que llega a la retina, variando el diámetro  $d$  (sobre un rango de 2 mm a 8 mm) de la apertura del ojo, conocida como la pupila. Esta apertura toma la forma de un hueco circular en el diafragma (o iris), un disco opaco localizado entre los lentes y la córnea.

La resolución espacial de la imagen de la retina, que determina cuán pequeño puede ser un objeto, y que tan identificable es respecto a otro objeto adyacente y similar, está determinada por tres factores:

- El tamaño de las células receptoras;
- Las imperfecciones en la imagen (conocidas como aberraciones);
- La difracción de la luz que entra por la pupila del ojo;



**Figura 1.1.** (a) Una concepción física del ojo humano, mostrando dos rayos de luz enfocados en un punto de la retina, donde  $\alpha$  es el ángulo entre el rayo incidente y el eje óptico,  $d$  es el diámetro de apertura de la pupila, (b) Diagrama de rayos para un objeto *distante* mostrando rayos de luz *paralelos* que llegan de puntos opuestos del objeto (línea sólida y punteada) y forman una imagen (en aire) a una distancia  $f$  (la distancia focal),  $\Delta\theta$  es la variación del ángulo de incidencia de los rayos con respecto al eje óptico. (c) Diagrama de rayos para un objeto *cercano* (distancia objeto  $u=25$  cm, distancia imagen  $v$  levemente menor que  $f$ ),  $\Delta R$  es la diferencia en la posición relativa de un punto de un objeto cercano.<sup>[2]</sup>

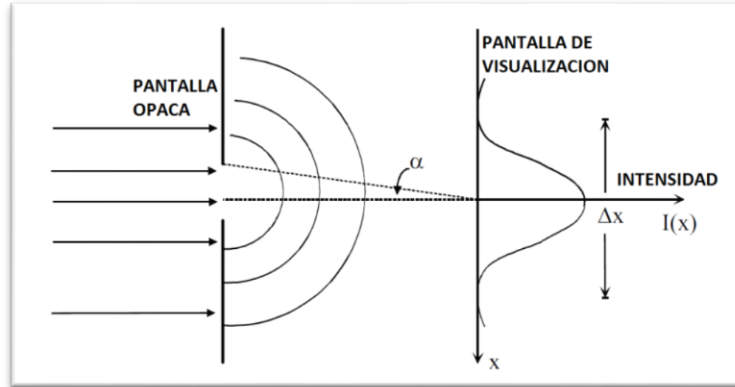
La *difracción* no puede ser explicada usando solo un punto de vista geométrico u óptico; se requiere una interpretación ondulatoria (física óptica), de acuerdo con la cual una imagen es realmente un patrón de interferencia formado por rayos de luz que toman diferentes caminos para llegar al mismo punto en la imagen.

En la situación simple que se muestra en la figura 1.2, un haz de luz de rayos paralelos incide en un diafragma opaco que contiene una abertura circular cuyo radio subtende un ángulo  $\alpha$  respecto a la normal a una pantalla de visualización. La luz que atraviesa la abertura ilumina la pantalla en forma de un patrón circular con límites difusos (disco de confusión) cuyo diámetro  $\Delta x$  excede el de la abertura, de hecho, de acuerdo con el criterio Rayleigh, cuanto más pequeña la abertura, más grande el disco de confusión en la pantalla, así:

$$\Delta x \approx \frac{0,6 \lambda}{\sin \alpha} \quad (1.1)$$

con  $\lambda$  siendo la longitud de onda de la luz difractada. La ecuación (1.1) puede ser aplicada al ojo humano con la adición que se muestra en la figura 1.1b, en la cual se esquematiza una imagen equivalente formada en el aire a una distancia  $f$  de una lente simple. Para longitudes de onda en la región del espectro visible,  $\lambda \approx 500 \text{ nm}$ , y tomando  $d \approx 4 \text{ mm}$  y  $f \approx 2 \text{ cm}$  y de acuerdo con la geometría de la figura 1.1b, se tiene que  $\tan \alpha \approx d/2f = 0.1$ , es decir, un valor pequeño de  $\alpha$ , lo que permite usar la aproximación para ángulos pequeños  $\tan \alpha \approx \sin \alpha$ . A partir de la ecuación (1.1) se obtiene un valor para el diámetro del disco de confusión de

$$\Delta x \approx (0,6)(500 \text{ nm})/0,1 = 3 \text{ }\mu\text{m}.$$



**Figura 1.2.** Difracción de la luz que pasa por una rendija o abertura circular. Las ondas de luz atraviesan la abertura para producir un disco de confusión (disco de Airy) cuya distribución de intensidad  $I(x)$  se muestra en el lado derecho de la gráfica<sup>[2]</sup>.

Las *aberraciones* en el ojo contribuyen con una cantidad aproximadamente igual al desenfoque de la imagen, que de acuerdo con los cálculos anteriores, se toma como siendo de  $3 \mu\text{m}$ . Además, las *células receptoras* de la retina tienen diámetros en el intervalo de 2 a  $6 \mu\text{m}$  (para un valor medio de  $4 \mu\text{m}$ ).

Para una aproximación razonable, la contribución de los tres factores que determinan la resolución espacial de la imagen (esto es, que contribuyen al desenfoque o difuminación de la imagen retinal) pueden ser combinadas en cuadratura (adicionando cuadrados), y posteriormente aplicarles el proceso similar al análisis de errores en estadística. Usando este proceso, el desenfoque o difuminación total de la imagen estará dada por:

$$(\Delta)^2 = (3\mu\text{m})^2 + (3\mu\text{m})^2 + (4\mu\text{m})^2 \quad (1.2)$$

Que lleva a  $\Delta \approx 6 \mu\text{m}$  como la difuminación de la imagen retinal. Este valor corresponde a una difuminación angular para objetos distantes (ver figura 1.1b) de

$$\Delta\theta \approx (\Delta/f) \approx \frac{(6\mu\text{m})}{(2 \text{ cm})} \approx 3 \times 10^{-4} \text{ rad}$$



$$\Delta\theta \approx (1/60) = 1 \text{ minuto de arco} \quad (1.3)$$

Los objetos distantes pueden ser distinguidos separadamente si ellos subtenden ángulos más grandes que este. Para ver con más detalle el cielo nocturno, como las estrellas débiles de una galaxia, se requiere un telescopio, el cuál provee un aumento angular.

Con el cambio de la lente en un ojo adulto sólo se altera en un 10% la distancia focal total, entonces la distancia más corta a la que la retina puede enfocar un objeto es  $u \approx 25$  cm. A esta distancia una resolución angular de  $3 \times 10^{-4}$  rad corresponde a una dimensión lateral de:

$$\Delta R \approx (\Delta\theta)u \approx 0.075 \text{ mm} = 75 \mu\text{m} \quad (1.4)$$

Siendo  $u \approx 25$  cm la distancia más corta para una clara visión,  $\Delta R = 75 \mu\text{m}$  puede ser tomado como el *diámetro del objeto más pequeño que puede ser resuelto por el ojo humano* (es decir, se puede distinguir de sus vecinos cercanos). Por lo anterior  $\Delta R$  es conocida como la *resolución objeto* o la *resolución espacial en el plano objeto*.

Para resolver objetos pequeños de un diámetro  $D$  se requiere que el diámetro de magnificación en el plano objeto del ojo sea mayor o igual que la resolución  $\Delta R$  del ojo ( $\approx 75 \mu\text{m}$ ), en otras palabras se necesita un factor de magnificación (aumento)  $M^*$  (relación imagen/objeto):

$$M^* \approx (\Delta R)/D \quad (1.5)$$

En la tabla 1.1 se observan tamaños aproximados de algunos objetos. En la columna derecha se observan valores de la magnificación mínima requerida para distinguir objetos de diferentes diámetros.

Debido a que muchos objetos de interés científico tienen un diámetro menor a este  $\Delta R$ , tal como se observa en la tabla 1-1, se hace necesario contar con una herramienta

óptica con un factor de magnificación  $M^*$  mayor que 1 que posibilite su observación; en otras palabras, un *microscopio*.

A continuación se expondrá información básica sobre el microscopio óptico, el microscopio de rayos X, el microscopio electrónico de transmisión, el microscopio electrónico de barrido, el microscopio electrónico de transmisión-barrido, el microscopio electrónico analítico y el microscopio de sonda de barrido.

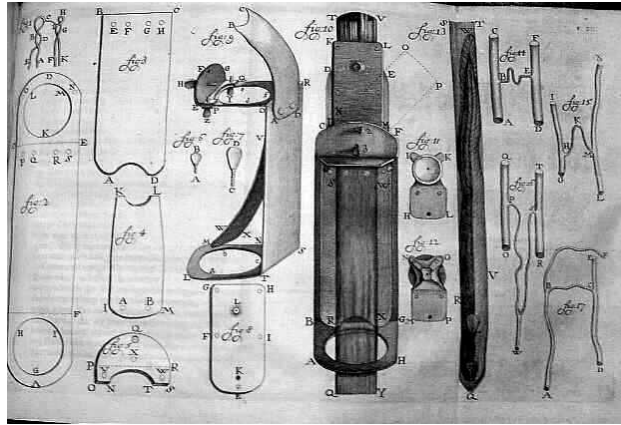
**Tabla 1-1. Tamaño aproximado de algunos objetos comunes y la respectiva magnificación  $M^*$  requerida para distinguirlos, de acuerdo con la ecuación (1.5)<sup>[2]</sup>.**

Objeto	Diámetro típico $D$	$M^* = 75 \mu\text{m}/D$
Grano de arena	1mm=1000 $\mu\text{m}$	Ninguna
Cabello humano	150 $\mu\text{m}$	Ninguna
Glóbulo rojo	10 $\mu\text{m}$	7.5
Bacteria	1 $\mu\text{m}$	75
Virus	20 nm	4000
Molécula de ADN	2 nm	40000
Átomo de Uranio	0.2 nm = 200pm	400000

## 1.5 El Microscopio Óptico

Un microscopio óptico es un instrumento basado en lentes ópticas que permite ver objetos diminutos; también se le conoce como microscopio de luz, (que utiliza luz o "fotones") o microscopio de campo claro.

Desde 1590, año en el que Zacharias Janssen inventó el microscopio compuesto, que constaba sólo de un tubo con dos lentes convexas, un objetivo (ubicado cerca del objeto a ser magnificado) y un ocular (localizado muy cerca del ojo) que producía una imagen aumentada de 3X a 9X<sup>[3]</sup> se han hecho constantes mejoras en los diseños originales. El primer avance significativo lo consiguió a mediados del siglo XVII Anton Van Leeuwenhoke al diseñar un microscopio óptico cuyo aumento alcanzó 270X, usando lentes delgadas ubicadas muy cerca al objeto y al ojo. En la figura 1.5 se observan detalles del diseño del microscopio van Leeuwenhoek<sup>1</sup>.



**Figura 1.5.** El microscopio de Antonvan Leeuwenhoek<sup>[2]</sup>.

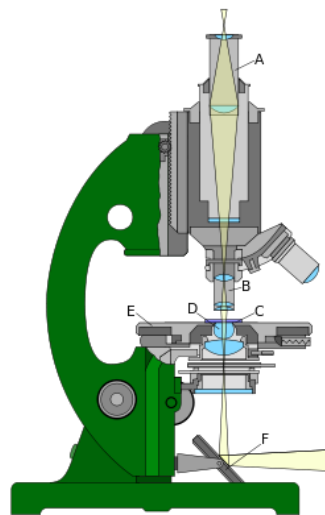
Posteriormente, científicos alemanes observaron células de sangre, bacterias y estructuras celulares de tejido animal al incrementar sus dimensiones o empleando un número mayor de lentes, la magnificación  $M^*$  de un microscopio compuesto puede aumentarse teóricamente hablando, sin límite.

---

<sup>1</sup>Antonvan Leeuwenhoek nació en Delft, Países Bajos, el 24 de octubre de 1632. Construyó para la observación de calidad de las telas lupas de mejor calidad que las que se podían conseguir en ese momento, tras aprender por su cuenta soplado y pulido de vidrio. Desarrolló estructuras tipo microscopio en la que se podían fijar tanto las lentes como el objeto a observar.

Sin embargo, un valor grande de  $M^*$  no garantiza que los objetos de diámetro despreciable puedan ser visualizados. Para satisfacer la ecuación (1.5) se debe asegurar que las aberraciones y la difracción internas del microscopio sean suficientemente pequeñas.

En la figura 1.3 se observa un esquema del microscopio óptico con sus partes y en la figura 1.4 se presentan fotografías de los microscopios ópticos de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca.



**Figura 1.3** Microscopio óptico. Descripción: A) Ocular, B) Lente objetivo, C) Portador del objeto, D) Lentes de la iluminación, E) Sujeción del objeto, F) Espejo de la iluminación.

Actualmente el efecto de las aberraciones en instrumentos ópticos puede ser despreciable puliendo la superficie de las lentes para corregir la forma o espaciando las lentes de modo que sus aberraciones sean compensadas. Sin embargo, incluso con tales correcciones de aberraciones, la resolución espacial de un microscopio compuesto está limitada por la difracción en la lente del objetivo. Este efecto depende del diámetro (apertura) de las lentes, tal como sucede con la difracción de la pupila del ojo. Con una lente de apertura grande ( $\sin \alpha \approx 1$ ), la ecuación (1.1) predice una resolución límite de

un poco más de la mitad de la longitud de onda de la luz, lo que fue deducido por Abbé en 1873<sup>2</sup>.



(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 1.4** Microscopios ópticos en la unidad de microscopía electrónica de la Universidad del Cauca. Descripción: A) estereoscopio, B) microscopio óptico, C) microscopio uv, D) microscopio óptico de alta resolución.

---

<sup>2</sup>En 1872, Abbe formuló su teoría de ondas de la imagen microscópica y definió, lo que se conoce, como la condición del seno de Abbe, la cual establece las condiciones que deben satisfacer las lentes, de un sistema óptico centrado para generar imágenes nítidas y libres de aberración esférica.

Para luz en la mitad del espectro visible ( $\lambda \approx 0,55\mu\text{m}$ ), se tiene la mejor resolución posible es de aproximadamente  $0,3 \mu\text{m}$ . Esto representa un sustancial aumento de la resolución ( $\approx 75 \mu\text{m}$ ) respecto al ojo. Pero para alcanzar esta resolución, el microscopio debe magnificar el objeto hasta un diámetro al menos igual a  $\Delta R$ , ya que la resolución global es determinada por la difracción del microscopio más que por las limitaciones del ojo, lo que requiere una magnificación del microscopio de  $M * \approx \left(\frac{75\mu\text{m}}{0,3\mu\text{m}}\right) = 250X$ .

Este instrumento ha sido de gran utilidad, sobre todo en los campos de la ciencia en donde la estructura y la organización microscópica es importante, incorporándose con éxito a investigaciones dentro del área de la química (en el estudio de cristales), la física (en la investigación de las propiedades físicas de los materiales), la geología (en el análisis de la composición mineralógica y textural de las rocas) y, por supuesto, en el campo de la biología (en el estudio de estructuras microscópicas de la materia viva), por citar algunas disciplinas de la ciencia.

Los microscopios ópticos son ampliamente usados en investigación y en general son clasificados en dos líneas: los microscopios biológicos y los microscopios metalúrgicos. Los **microscopios biológicos** requieren una muestra ópticamente transparente, tal como un corte delgado animal o vegetal. La imagen formada por la luz transmitida puede revelar componentes individuales (organelos) en el interior de cada célula biológica. Los **microscopios metalúrgicos** son usados para examinar metales y otros materiales que no pueden ser fácilmente cortados en láminas lo suficientemente delgadas para ser ópticamente transparentes. Así, la imagen será formada por la luz reflejada por la superficie de la muestra, revelando la microestructura de superficies, además de brindar la posibilidad de identificar cambios de fases presentes en una aleación metálica y determinar fronteras de grano.

## **1.6 El Microscopio de Rayos-X**

La denominación rayos-X designa a una radiación electromagnética, capaz de atravesar cuerpos opacos y de imprimir películas fotográficas. Los actuales sistemas digitales permiten la obtención y visualización de la imagen radiográfica directamente en un

computador sin necesidad de imprimirla. El motivo por el cual los rayos-x son considerados como posible iluminación para una muestra microscópica es que la longitud de onda de los rayos-x comprende un rango de 10 nm a 0,01 nm.

El físico Wilhelm Conrad Röntgen descubrió los rayos-x en 1895, mientras experimentaba con los tubos de Hittorff-Crookes y la bobina de Ruhmkorff para investigar la fluorescencia violeta que producían los rayos catódicos. Tras cubrir el tubo con un cartón negro para eliminar la luz visible, observó un débil resplandor amarillo-verdoso proveniente de una pantalla con una capa de platino-cianuro de bario, que desaparecía al apagar el tubo. Determinó que los rayos creaban una radiación muy penetrante, pero invisible, que atravesaba grandes espesores de papel e incluso metales poco densos. Usó placas fotográficas, para demostrar que los objetos eran más o menos transparentes a los rayos X dependiendo de su espesor. Los llamó "rayos incógnita", o "rayos X" porque no sabía qué eran, solo que eran generados por los rayos catódicos al chocar contra ciertos materiales, descubrimiento que le dio el premio Nobel de Física en 1901. En la figura 1.6 se muestra una "fotografía" de rayos-x tomada por Wilhelm Röntgen en enero de 1896.



**Figura 1.6.** Primera imagen de rayos X(radiografías)tomada en una conferencia pública por Wilhelm Röntgen(1845-1923) dela mano izquierda de Albert von Kölliker. El 23 enero de 1896[4].

La resolución de la microscopía de rayos X se ubica entre la microscopía óptica y la electrónica. Su ventaja sobre los microscopios electrónicos convencionales es que permite observar muestras biológicas en su estado natural. Como se verá en el capítulo II, la microscopía electrónica es ampliamente usada para obtener imágenes con nivel de resolución nanométrica, pero las relativamente gruesas células vivas no pueden ser observadas, por lo que es necesario que las muestras sean químicamente tratadas, para fijarlas, deshidratarlas, e incrustarlas en resina para luego ser cortadas en láminas muy finas.

Adicionalmente, los rayos X causan fluorescencia en muchos materiales, y esta emisión puede ser analizada para determinar los elementos químicos que los componen. Otro uso tiene que ver con el patrón de difracción, proceso usado en la cristalografía de rayos X. Analizando la reflexión interna en un patrón de difracción pueden ser determinadas características morfológicas y estructurales de un cristal.



### 1.3. Microscopia electrónica

A inicios del siglo XX, los físicos descubrieron que partículas tales como electrones poseen un carácter ondulatorio. Inspirado por la descripción de Einstein del fotón, Louis de Broglie propuso que todas las partículas tienen una longitud de onda asociada, vinculada a su impulso:

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (1.6)$$

donde  $m$  y  $v$  son la masa relativista y la velocidad de la partícula, respectivamente, y  $h$  la constante de Planck. Para electrones emitidos por un filamento caliente en el vacío que atraviesan un potencial de aceleración de 50 V, la velocidad es aproximadamente igual a  $4,2 \times 10^6$  m/s y la longitud de onda  $\lambda = 0,17$  nm. Debido a que esta longitud de onda es comparable a las dimensiones atómicas, los electrones “lentos” son fuertemente difractados por un arreglo regular de átomos como en la superficie de un cristal, esto fue observado por primera vez por Davisson y Germer (1927)<sup>[5]</sup>. Aumentando el potencial de aceleración hasta 50 kV, la longitud de onda alcanza alrededor de 5 pm ( $\lambda = 0,005$  nm) con lo cual estos electrones de alta energía son capaces de penetrar varios micrómetros (mm) en el sólido. Si el sólido es cristalino, los electrones son difractados por los planos atómicos del material, como en el caso de los rayos-X. Es posible entonces formar un patrón de difracción de los electrones que logran atravesar la muestra, como fue demostrado por primera vez por G.P. Thomson (1927). Posteriormente se conjeturó que si estos electrones transmitidos podían ser enfocados, su longitud de onda muy corta permitiría que la imagen formada tuviera una resolución espacial mucho mejor que la de un microscopio óptico.

El enfoque del haz de electrones se basa en que, sumado a su carácter de onda, ellos son partículas cargadas negativamente, por lo cual pueden ser desviados por la acción de campos eléctricos y magnéticos. Este principio fue usado en los tubos de rayos catódicos, en las pantallas de TV y en las de los computadores, de hecho, el primer microscopio electrónico basado en esta tecnología fue desarrollado para aplicaciones de radar de tubo de rayos catódicos

### **1.3.1. El Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).**

En un microscopio electrónico de transmisión (MET), los electrones penetran en una muestra delgada y luego de atravesarla son enfocados para formar una imagen, guardando estrecha analogía con los microscopios de luz.

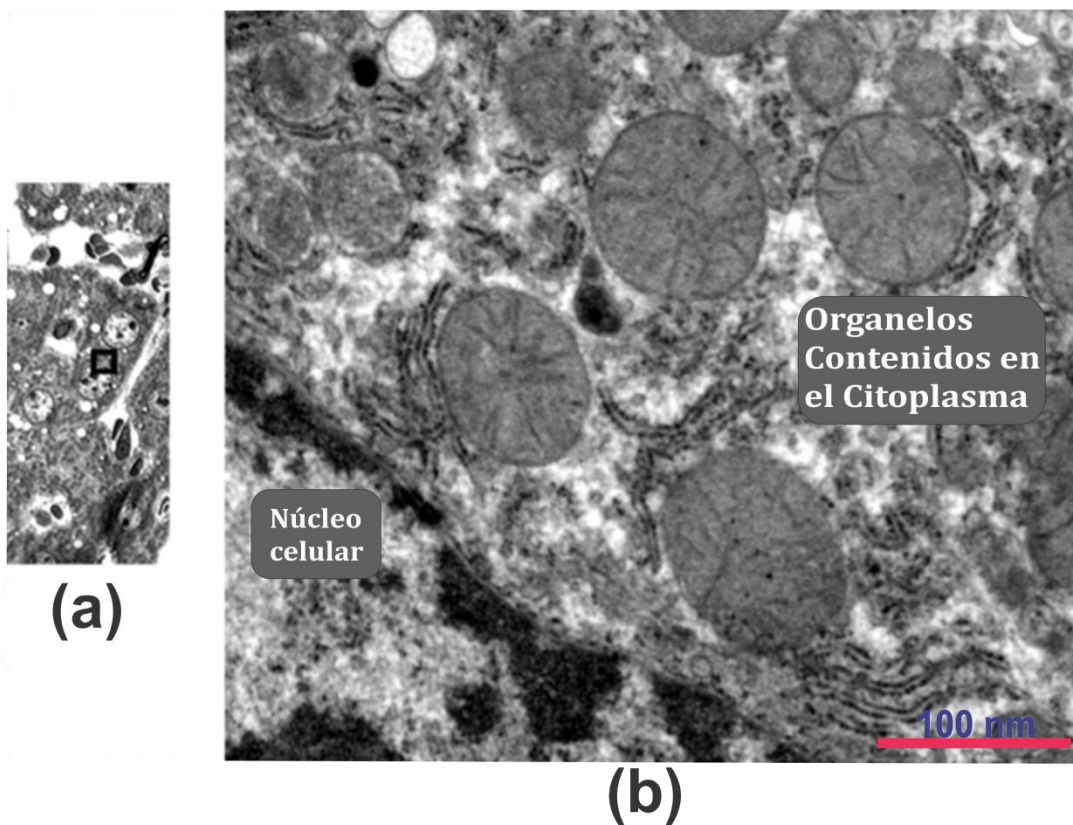
Aunque compañías en Estados Unidos, Holanda, el Reino Unido, Alemania, Japón, China, la antigua Unión Soviética, y Checoslovaquia alguna vez fabricaron METs, actualmente esta competencia se ha reducido a 4 países: el laboratorio de óptica electrónica de Japón (JEOL), Hitachi, también de Japón, Phillips y FEI en Holanda y Estados Unidos respectivamente y ZEISS en Alemania.

El MET ha probado ser invaluable para examinar la microestructura de los metales. Defectos en una red cristalina, más conocidos como dislocaciones, fueron predichos por teóricos al estudiar el hecho de que los metales se deforman bajo fuerzas inferiores a las calculadas para un arreglo cristalino perfecto de átomos, predicción que fue comprobada por una imagen de una muestra de aluminio en un MET.

El MET ha sido igualmente usado en ciencias biológicas, por ejemplo en la observación de muestras vegetales y animales, bacterias y virus. La figura 1.7 muestra imágenes de una muestra de células de ratón obtenidas por microscopía óptica y microscopía electrónica, las membranas celulares y algunos organelos internos son visibles en el microscopio óptico, pero la imagen del MET revela muchas más estructuras en los organelos gracias a su mayor resolución espacial.

Aunque la mayoría de los MET modernos usan voltajes de aceleración que oscilan entre 100kV y 300kV, existen algunos llamados Microscopios Electrónicos de Alto Voltaje (HVEM), que usan voltajes de aceleración de hasta 3MV. La principal motivación para los fabricantes es la reducción en la longitud de onda de Broglie de los electrones como consecuencia del alto potencial de aceleración y que, por supuesto, ofrecen una mayor resolución espacial de la imagen. Sin embargo, los problemas con la estabilización de estos instrumentos han impedido alcanzar la resolución espacial teórica. Algunos pocos siguen en servicio activo ofreciendo la ventaja de observar

muestras más “gruesas” ya que los electrones de tan alta energía pueden penetrar en los sólidos un poco más de 1  $\mu\text{m}$  sin sufrir dispersiones significativas.



**Figura 1.7.** En el análisis de células de hígado de ratón, la imagen del MET (b) corresponde aproximadamente al área rectangular marcada en la imagen del microscopio óptico (a)<sup>[2]</sup>.

### 1.3.2 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

Una de las limitaciones del MET es que aunque la muestra sea muy delgada, los electrones son fuertemente dispersados por esta, o incluso absorbidos antes de ser transmitidos. Esta dificultad llevó a la necesidad de desarrollar un microscopio electrónico capaz de examinar muestras relativamente gruesas, en otras palabras era necesario un microscopio semejante al óptico metalúrgico pero con una fuente de radiación de alta energía como un haz de electrones.

Los electrones en el MEB son “reflejados” (retrodispersados) por la muestra gruesa como en el experimento original de Davidson y Gerner (1927). Los electrones que inciden sobre la muestra (electrones primarios), transmiten su energía a los electrones

atómicos presentes en la muestra, que a su vez pueden ser expulsados de esta como electrones secundarios. Estos electrones son emitidos en un rango de energías, lo que hace muy difícil enfocarlos para lograr una imagen, sin embargo hay un modo alternativo de formación de la imagen que utiliza un principio de barrido sobre la muestra. Los electrones primarios son enfocados en una región con un diámetro muy pequeño que hace un barrido por toda la muestra, usando el hecho de que los campos electrostáticos y magnéticos, aplicados en el ángulo correcto, pueden cambiar la trayectoria del haz. Puede ser cubierta un área cuadrada o rectangular de la muestra por barrido simultáneo en dos direcciones perpendiculares, y se puede formar una imagen de esta área recolectando los electrones secundarios emitidos en cada punto de la muestra.

En los laboratorios RCA en New Jersey fue desarrollado un microscopio electrónico de barrido basado en la emisión de electrones secundarios<sup>[6]</sup>. Algunos de los primeros prototipos empleaban una fuente de emisión de campo<sup>3</sup> (FEG) mientras que los modelos siguientes usaron filamentos calientes para emitir electrones que a su vez eran enfocados y direccionados hacia la muestra usando lentes electromagnéticas. Una primera versión de lo que ahora conocemos como FAX era usado para imprimir una imagen, la resolución espacial estimada fue de 50 nm, cerca de diez veces mayor que los microscopios ópticos de la época.

Otros desarrollos del MEB ocurrieron después de la segunda guerra mundial cuando Charles Oatley y algunos de sus colegas iniciaron un programa de investigación y construcción en el Departamento de ingeniería de la Universidad de Cambridge. Sus primeras imágenes provenientes del MEB fueron obtenidas en 1951 y un modelo comercial de MEB (construido por la compañía AEI) fue entregado al instituto de investigación de pulpa y papel de Canadá en 1958. Un microscopio electrónico de barrido moderno brinda una imagen con una resolución típica de entre 1 nm y 10 nm.

---

<sup>3</sup>Los **emisores de campo (FEG)** por sus siglas en inglés) son componentes electrónicos capaces de arrancar electrones de un sólido por la acción exclusiva de un campo eléctrico fuerte.

### **1.3.3 Microscopio Electrónico de transmisión-barrido (STEM).**

Es posible emplear la técnica de escaneo con una sonda fina en una muestra delgada y recoger, más que electrones secundarios, electrones que emergen del lado opuesto de la muestra en una dirección en particular. El resultado es un microscopio electrónico de transmisión-barrido (STEM). El primer STEM fue construido por Von Ardenne en 1938. Hoy en día muchos microscopios electrónicos de transmisión tienen herramientas de barrido que los hacen funcionales como microscopios MET y STEM.

### **1.3.4 Microscopio Electrónico Analítico**

Todos los microscopios expuestos hasta ahora producen imágenes que dan información sobre la microestructura de la muestra, en algunos casos hasta en escala atómica. Pero a menudo es necesaria información química, como la composición química local. Para este propósito, se requiere de algunas respuestas de la muestra relacionadas con el número exacto  $Z$  de electrones. Si el número  $Z$  se incrementa la carga nuclear se incrementa, afectando los electrones que viajan cerca del núcleo y cambiando su energía.

Los electrones que son importantes para el estudio de las propiedades y composición son los electrones más internos, no los de valencia, esto debido a que los electrones internos no hacen parte del enlace químico, por lo que sus energías no son afectadas por los átomos vecinos, permitiéndoles ser un indicativo de la carga nuclear y por tanto, del número atómico.

Cuando un electrón de una capa interna sufre una transición de un estado más alto a un estado más bajo de energía, emite un fotón de rayos X, cuya energía ( $hf = hc/\lambda$ ) es igual a la diferencia entre los dos niveles cuánticos. Esta propiedad es empleada en un tubo de rayos X, donde electrones primarios bombardean un blanco sólido (el ánodo) y excita los electrones de la capa interna hacia un nivel de energía mayor. En el proceso de desexcitación se generan rayos X característicos. Similarmente, los electrones primarios que entran una muestra para MET, MEB o STEM causan emisión de rayos X y, por la identificación de la longitud de onda o la energía de los fotones, es posible

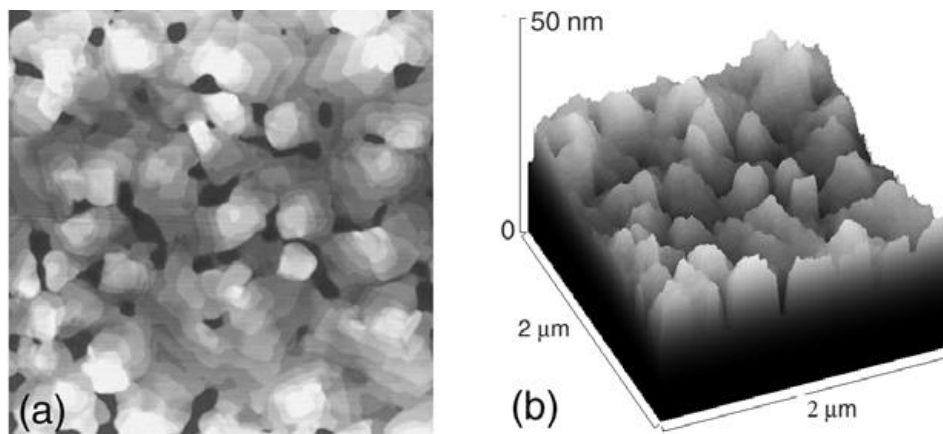
hacer el análisis químico. Hoy en día, un espectrómetro de emisión de rayos X es una herramienta adicional en los MET, MEB y STEM convirtiendo el instrumento en un microscopio electrónico analítico (AEM).

#### **1.4. Microscopio de Barrido por Sonda (AFM)**

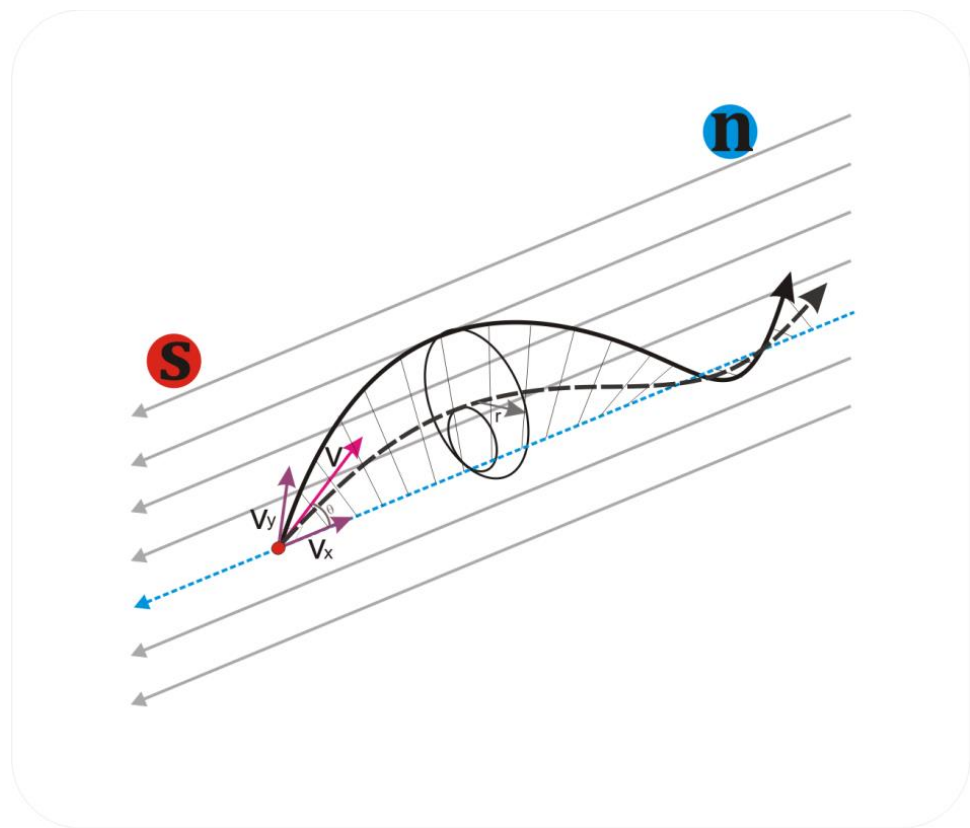
El método de formación de imagen por barrido es también empleado en un Microscopio de barrido por sonda (o microscopio de fuerza atómica, AFM por sus siglas en inglés), donde una sonda con una punta muy delgada es mecánicamente acercada a la muestra haciendo un barrido sobre la superficie con el fin de determinar algunas propiedades locales. El primero de estos tipos de dispositivo que alcanzó una buena resolución espacial fue el microscopio de barrido por tunelamiento (STM) el cual usa una delgada punta conductora de aproximadamente 1 nm de diámetro con una pequeña diferencia de potencial aplicado (1V). Si la muestra y la sonda son conductores eléctricos los electrones se mueven entre la sonda y la muestra por el proceso que en mecánica cuántica es conocido como *tunelamiento*. Este fenómeno es el resultado del carácter ondulatorio del electrón, y es análogo a la filtración de luz visible entre las superficies internas de dos espejos (llamada a veces, reflexión interna frustrada).

Acercar la punta de la sonda a 1 nm de distancia de una superficie (sin tocarla) requiere de gran precisión mecánica, de la ausencia de vibración y de la presencia de un mecanismo de retroalimentación. Debido a que las corrientes de tunelamiento aumentan dramáticamente con la disminución de la separación sonda-muestra, se calibra un sistema de motores para mover la sonda a lo largo de la muestra, acercándola (en la dirección z) hasta un valor predeterminado de corriente de tunelamiento (por ejemplo, 1 nA). Como consecuencia, la distancia sonda-muestra es alrededor de 1 nm y es posible medir ajustes precisos en el eje z con un material piezoeléctrico (cristal cerámico que cambia sus dimensiones cuando se le aplica una diferencia de potencial). Si la distancia disminuye, debido por ejemplo a la expansión o contracción térmica, la corriente de tunelamiento debe empezar a incrementar, aumentando el voltaje a través de una resistencia en serie. Este cambio de voltaje es

amplificado y aplicado al piezoeléctrico disminuyendo la distancia punta-superficie hasta llevar la corriente a su valor original. Tal arreglo es llamado retroalimentación negativa debido a que la información acerca de la distancia es enviada de regreso al sistema electromecánico, que actúa para mantener la distancia constante. Para el funcionamiento del microscopio de barrido, la sonda barre la superficie de la muestra en las direcciones  $x$  y  $y$ , usando dispositivos piezoeléctricos. Si el mecanismo de retroalimentación negativa se mantiene activo, la distancia entre la punta y la muestra se mantendrá constante en sincronismo exacto con la topografía de la superficie. En la figura 1.8 se presenta una imagen de una película de semiconductor orgánico obtenida con un AFM.



**Figura 1.8.** Imagen obtenida con un microscopio de barrido por sonda de la superficie de una película delgada de un semiconductor orgánico (a) la modulación del brillo en cada cambio brusco se representa por una grafica de niveles(trazas), (b)Imagen de la superficie de la película. Imagen de Hui Qian, University of Alberta<sup>[2]</sup>.



## Capítulo II: Óptica Electrónica



El inicio de la física que soporta la ingeniería de la microscopía electrónica es, tal vez, el descubrimiento hecho a principios del siglo XX de que las partículas materiales como el electrón tienen un carácter ondulatorio.

En 1923, Louis de Broglie mostró, basado en la descripción de Einstein del fotón, que todas las partículas tienen una longitud de onda asociada ( $\lambda$ ), vinculada a su impulso ( $P = mv$ ).

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (2.1)$$

donde  $m$  y  $v$  son la masa y la velocidad de la partícula, respectivamente, y  $h$  la constante de Planck. Mediante el uso de electrones de alta energía, en la microscopía electrónica son posibles longitudes de onda de Broglie mucho más cortas que las longitudes de onda ópticas, lo que posibilita resoluciones hasta el nivel de los Å.

Existe una estrecha relación entre el funcionamiento de un microscopio óptico y un microscopio electrónico, tal como se observa en la figura 2.1. La “óptica” de los electrones tiene mucho en común con la óptica de la luz (de fotones), por lo que es posible imaginar electrones individuales partiendo de un objeto y siendo enfocados para formar una imagen, análogamente como sucede con los fotones en la formación de imágenes con lentes. Como resultado de esta analogía la trayectoria de los electrones puede ser representada por un diagrama de rayos.

La fuente de “iluminación” del microscopio electrónico (primera pieza clave) es la fuente de electrones: un filamento de tungsteno que al ser calentado forma una nube de electrones por el efecto termoiónico, luego la nube de electrones es sometida a un voltaje que los acelera permitiéndoles ganar cierta energía cinética que está directamente relacionada con la longitud de onda y por lo tanto con la resolución espacial del instrumento. Puesto que los electrones alcanzan velocidades comparables a la de la luz, hay que hacer consideraciones relativistas para llegar a la expresión de la relación entre el voltaje  $V_a$  de aceleración y la longitud de onda alcanzada:

$$\lambda = \frac{h}{[2mV_a e] \left(1 + \frac{eV_a q}{2mc^2 e}\right) mv} \quad (2.2)$$

donde  $m$  es la masa en reposo del electrón,  $c$  la velocidad de la luz y  $e$  es la carga del electrón.

Remplazando los valores constantes que se conocen la expresión se reduce a:

$$\lambda = \frac{1,2261}{\sqrt{V_a} \sqrt{1 + 9,880 * 10^{-7} * V_a}} [nm] \quad (2.3)$$

Aunque esta longitud de onda es el límite de resolución del microscopio electrónico, la resolución de las micrografías es inferior y se debe a las características de la muestra, la operación del microscopio y a las condiciones de adquisición de la imagen. El haz de electrones emitido por el filamento caliente de tungsteno, (o filamento de LaB6 - hexaboruro de lantano) es colimado y posteriormente pasa a través de un sistema de lentes condensadores para después incidir sobre la muestra. La lente objetivo, situada inmediatamente debajo de la muestra, produce la imagen ampliada que finalmente se proyecta en una pantalla fluorescente o sobre una placa fotográfica. El tamaño del haz puede ser variado pero es típicamente de una micra de diámetro, por lo tanto se pueden analizar pequeñas áreas seleccionadas de la muestra.

Una de las características más relevantes de los microscopios electrónicos de transmisión es su capacidad para mostrar patrones de difracción. En este caso, el haz incidente es difractado por la estructura atómica de la muestra como resultado de la naturaleza ondulatoria de los electrones. El patrón de difracción puede proporcionar información sobre la estructura cristalina de la muestra y es particularmente útil cuando la disposición atómica es regular y periódica, como en un cristal.

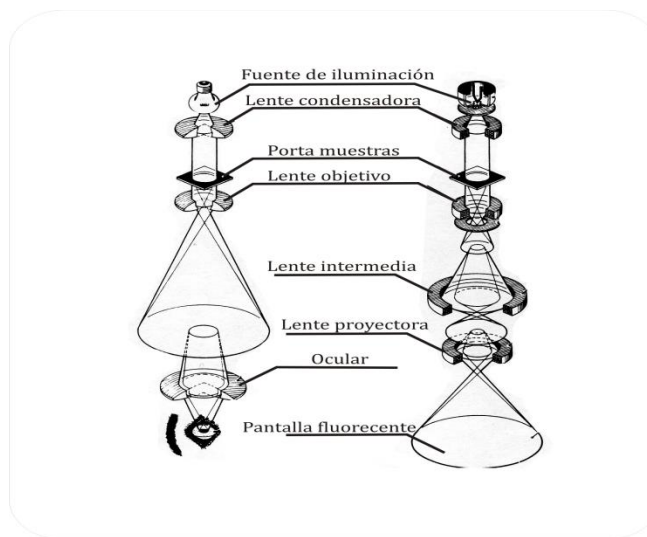
## 2.1 Formación de la Imagen

Es claro que una imagen debe ser completamente equivalente al objeto al que corresponde. Esta equivalencia fue determinada por James Clark Maxwell, quien llegó a

establecer principios y condiciones necesarias para considerarla que una imagen equivalente es ideal, así:

- ✓ Por cada punto en el objeto, debe existir un punto equivalente en la imagen;
- ✓ El objeto y la imagen deben ser geoméricamente similares;
- ✓ Si el objeto es planar y perpendicular al eje óptico también debe serlo la imagen;

En la formación de imágenes en los microscopios óptico y electrónico figura 2.1 se deben cumplir estos principios y son considerados para determinar la calidad de la imagen formada.



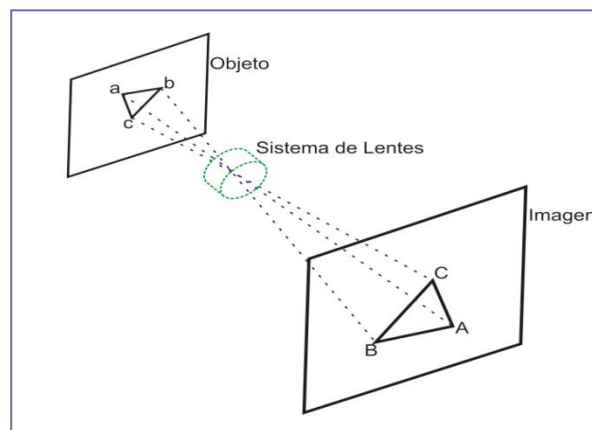
**Figura 2.1.** Comparación entre el funcionamiento de un microscopio óptico y los microscopios electrónicos [7].

Los principios de Maxwell también son usados para categorizar los defectos en imágenes formadas. A continuación se analiza cada uno de los principios;

**Regla 1-** Para un punto en el objeto se debe definir un punto equivalente en la imagen. En muchos tipos de microscopia, la conexión entre estos dos puntos es hecha por algún tipo de partícula (ej: electrón o fotón) que sale del objeto y llega al punto correspondiente en la imagen. El recorrido lo hace mediante dispositivos de enfoque (lentes) y su trayectoria puede ser descrita por el camino de un rayo. Un camino en particular es llamado *eje óptico*. Si no hay espejos involucrados, el eje óptico es una línea recta que pasa a través del centro de la lente (lentes).

Esta regla se satisface dependiendo de las propiedades de las lentes. Por ejemplo, si la intensidad de enfoque es incorrecta, la imagen formada en un plano en particular estará fuera de foco. Las partículas que parten de un punto del objeto llegarán a algún lugar dentro de un círculo que rodea la posición ideal del punto en la imagen, círculo llamado *disco de confusión*. Pero incluso si la capacidad de enfoque es apropiada, una lente real puede producir un disco de confusión como resultado de **aberraciones** en su interior: las partículas que tengan energía diferente o que tomen diferentes caminos después de partir del objeto, llegarán desplazados respecto a la posición ideal del punto en la imagen. La imagen entonces aparece borrosa, con pérdida de detalles finos, justo como en el caso de una imagen fuera de foco.

**Regla 2:** Si se consideran puntos en el objeto que forman un patrón, los puntos equivalentes en la imagen tendrán que formar un patrón similar en lugar de ser distribuidos al azar como se muestra en la figura 2.2. Donde se muestra tres puntos de un objeto que definen un triángulo y sus tres puntos equivalente en la imagen, entonces sus posiciones en la imagen deberán representar un triángulo similar en el sentido geométrico (es decir, contendrá los mismos ángulos).



**Figura 2.2.** Rotación de un patrón geométrico por magnificación en una lente o sistema de lentes magnéticas<sup>[2]</sup>.

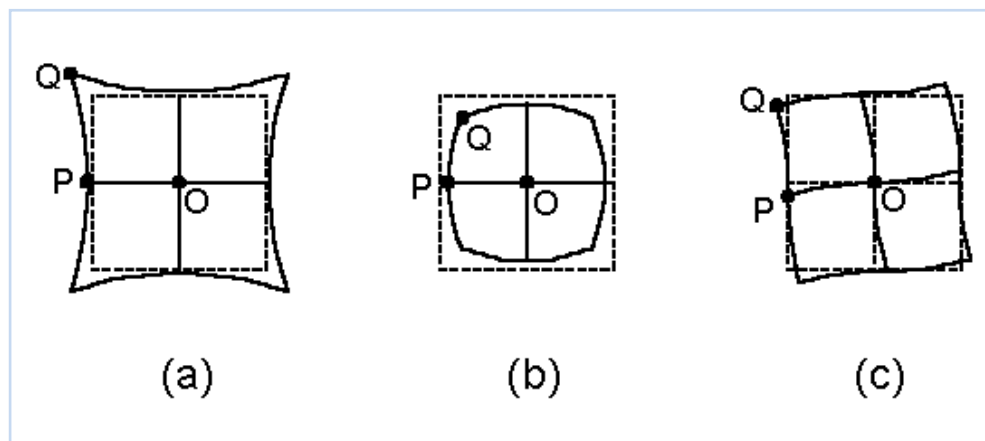
Los puntos en el triángulo de la imagen pueden tener una orientación diferente a la que tienen los puntos que definen el triángulo en el objeto; por ejemplo podrían estar invertidos (respecto al eje óptico) sin violar la regla 2 (tal como se observa en la figura

2.2). Además la separación de los tres puntos en la imagen puede diferir de la separación de los tres puntos en el objeto por un factor de **magnificación**  $M^*$ , en cuyo caso la imagen es magnificada (si  $M^* > 1$ ) o reducida (si  $M^* < 1$ ).

Aunque la imagen formada por una lente de vidrio puede parecer similar al objeto, una inspección detallada puede revelar la presencia de **distorsiones**. Este efecto es más pronunciado si el objeto contiene líneas rectas, las cuales aparecerán como líneas curvas en la imagen distorsionada.

La presencia de distorsiones en la imagen es el resultado de una variación del factor de magnificación respecto a la posición del objeto o de la imagen. Se pueden presentar tres casos de distorsión dependiendo de la distancia de los rayos al eje óptico, así:

- La *distorsión pincushion (de almohada)*, que corresponde al incremento de  $M^*$  con la distancia radial (ver figura 2.3a).
- La *distorsión de barril*, que se presenta porque  $M^*$  disminuye con la distancia al eje óptico (ver figura 2.3b).
- La *distorsión espiral*, es un tipo de distorsión que se incrementa con la distancia al eje como resultado de rotación de la imagen, causada por algunas lentes electrónicas. (ver figura 2.3c).



**Figura 2.3.** Distorsión en la imagen: (a) *distorsión pincushion*, (b) *distorsión de barril*, (c) *distorsión espiral*<sup>[2]</sup>

**Regla 3:** Usualmente las imágenes existen en dos dimensiones y ocupan una superficie plana. Aun si el objeto correspondiente es tridimensional, solo un plano objeto en particular se podrá enfocar en la imagen, de hecho las pruebas a las lentes se hacen con un objeto plano y la imagen se forma también en una pantalla plana. Pero si el poder de enfoque de las lentes depende de la distancia de un punto en el objeto respecto al eje óptico, regiones diferentes en la imagen estarán siendo enfocadas en diferentes puntos por las lentes. El sistema óptico entonces sufre **curvatura de campo**: la imagen se formará en una superficie curva y no en una plana. Las cámaras comunes corrigen este defecto curvando la película fotográfica. El telescopio astronómico Schmit, ubicado en el observatorio Monte Palomar en San Diego California. EE.UU., fue diseñado para registrar una imagen bien enfocada de una gran sección del cielo en placas cuadradas de vidrio ubicadas en una sección de una esfera.

En resumen, las **aberraciones** ocurren cuando se rompe la regla 1 de Maxwell: la imagen aparece borrosa debido a que los rayos que vienen de un punto en el objeto están siendo enfocados en un disco en lugar de en un punto en la imagen. La **distorsión** ocurre cuando la regla 2 se rompe como resultado de un cambio en la **magnificación** de la imagen(o rotación) con su posición en el plano objeto. Si la regla 3 se rompe hay un cambio en la capacidad de enfoque con la posición del punto en el plano objeto, produciéndose una **curvatura de campo**.

Siendo que en un microscopio electrónico la iluminación es del tipo electrónica (electrones), es necesario el uso de "lentes" capaces de afectar este tipo de radiación.

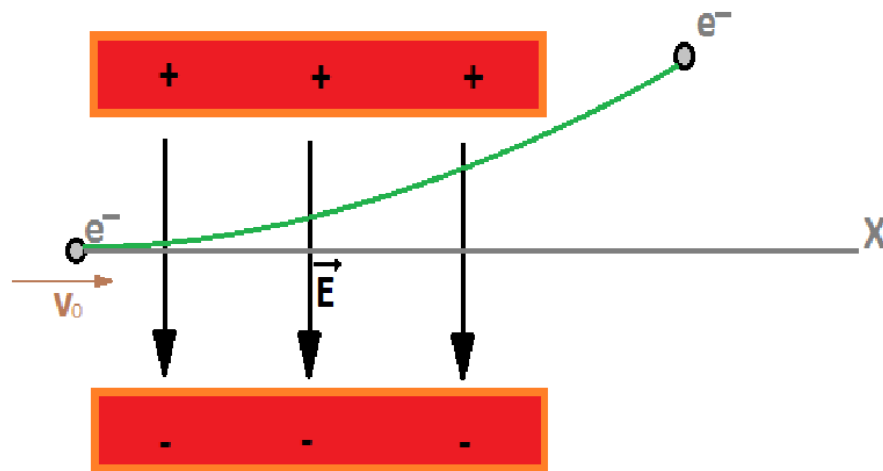
Para obtener el equivalente de una lente para electrones hay que tener en cuenta que lo que se quiere es desviar el rayo de electrones con respecto al eje óptico. Los electrones son fuertemente esparcidos y absorbidos tan pronto entran en un sólido, lo que no es posible usar las lentes de vidrio usadas en los microscopios ópticos; para enfocar los electrones hay que valerse de algunas de sus propiedades intrínsecas, por ejemplo el hecho de que el electrón es una carga electrostática y como consecuencia puede ser desviado por la presencia de campos eléctricos: El haz de electrones puede ser analizado de forma análoga a la corriente que fluye por un circuito, afectada o

desviada por campos magnéticos. Teniendo en cuenta lo anterior, un haz de electrones puede ser enfocado implementado lentes electrostáticas, magnéticas y electromagnéticas.

## 2.2. Lentes Electrostáticas.

Una lente electrostática es un dispositivo utilizado para direccionar partículas cargadas. Por ejemplo, se puede guiar electrones emitidos a partir de una muestra hasta un analizador de electrones, de forma análoga a la función de una lente óptica durante el transporte de la luz en un instrumento óptico. En la figura 2.4. se observa el efecto de un campo eléctrico en la trayectoria de un electrón moviéndose a través del eje  $x$  y entrando con velocidad  $v_0$  a la zona de aplicación del campo eléctrico  $\vec{E}$ .

Para entender el funcionamiento de una lente electrostática es útil partir del análisis de un campo eléctrico uniforme producido entre dos placas conductoras paralelas. Tal como se observa en la figura 2.4, un electrón en este campo eléctrico experimentará una fuerza constante independientemente de su trayectoria.

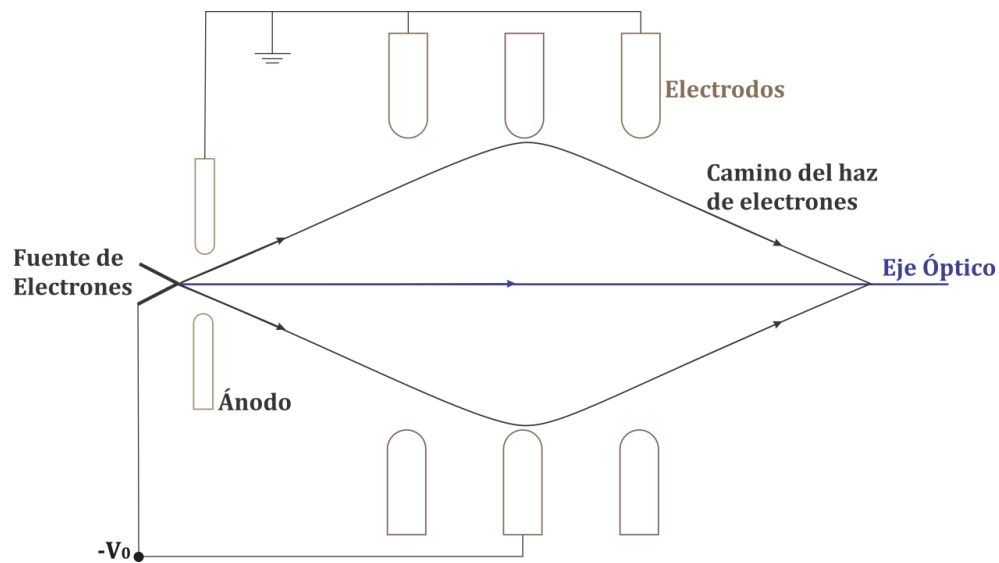


**Figura 2.4.** Trayectoria de un electrón bajo la influencia de un campo eléctrico. El electrón que ingresa en la zona de influencia del campo eléctrico  $\vec{E}$  con velocidad inicial  $v_0$  a través del eje  $x$ .

Esta disposición del campo es adecuada para desviar el haz, tal como sucede en un tubo de rayos catódicos, pero no sirve para enfocarlos, por lo que las lentes electrostáticas

más simples consisten en un electrodo circular (disco o tubo), con su centro alineado con el eje óptico, conectado a un potencial negativo.

Debido a la simetría del dispositivo, un electrón que pase por el eje óptico se verá afectado en del mismo modo por todos los puntos del electrodo y entonces no sufrirá desviación, por cuanto las fuerzas se anularán entre ellas. En cambio un electrón que no se mueva a lo largo del eje óptico será repelido por la carga negativa del electrodo hacia el eje óptico, tal como se observa en la figura 2.5.



**Figura 2.5.** Configuración estándar de una lente electrostática [2].

Debido a que el campo generado puede afectar por su rango de acción a los electrones más de lo deseado, se usan electrodos adicionales ubicados antes y después de la lente para delimitar la acción del campo producido por

el electrodo central. Estos electrodos, y en consecuencia el campo producido por ellos, son cilíndricos, o eje-simétricos, lo cual asegura que la fuerza de enfoque dependa solo de la distancia radial de un electrón al eje óptico y sea independiente de su dirección acimutal a través del eje.

### 2.3 Lentes Magnéticas

Una lente magnética consiste en una bobina a través de la cual pasa una corriente directa produciendo un campo magnético. Análogamente a lo que se discutió para las



lentes electrostáticas, un campo uniforme (aplicado perpendicularmente al haz) produciría un cambio de dirección pero no necesariamente un enfoque del haz, para enfocarlo entonces se requiere que el campo magnético producido tenga simetría axial.

De acuerdo con la teoría electromagnética, la fuerza  $F$  que actúa sobre un electrón de carga  $-e$  moviéndose con velocidad  $\mathbf{v}$  bajo la acción de un campo magnético  $\vec{B}$  está dada por:

$$F = -e(\vec{v} \times \vec{B}) \quad (2.2)$$

La dirección de  $F$  es perpendicular a  $\mathbf{v}$  y a  $\mathbf{B}$ , por lo tanto  $F$  no tiene componentes en la dirección del movimiento, manteniéndose la velocidad del electrón constante, sin embargo, debido a que  $B$  (y posiblemente  $v$ ) cambian continuamente, también lo hace la magnitud de la fuerza. De acuerdo con (2.2), la magnitud de la fuerza está dada por:

$$F = -evB \sin(\theta) \quad (2.3)$$

donde  $\theta$  es el ángulo entre  $v$  y  $B$  en cualquier punto de la trayectoria del electrón. Al pasar por el campo magnético de las bobinas los electrones se desvían (enfocan) sin ningún cambio en su energía cinética, sin embargo giran alrededor del eje óptico por la fuerza magnética actuante sobre ellos. Para los rayos que no pasan por el eje óptico el movimiento es un poco más complicado, pudiendo ser analizado usando la ecuación (2.2) en combinación con la segunda ley de Newton.

Tomando  $\mathbf{v}$  y  $\mathbf{B}$  en términos de sus componentes vectoriales, y recordando la simetría axial del campo:  $z$ ,  $r$  (distancia radial respecto del eje óptico) y  $\phi$  (ángulo acimutal que representa la dirección del vector radial  $r$  relativa al plano de la trayectoria inicial), tal como se muestra en la figura 2.6.,  $V_z$ ,  $V_r$ , y  $V_\phi$  serán las componentes axial, radial y tangencial respectivamente de la velocidad del electrón, a su vez,  $B_z$  y  $B_r$  serán las componentes axial y radial del campo magnético.

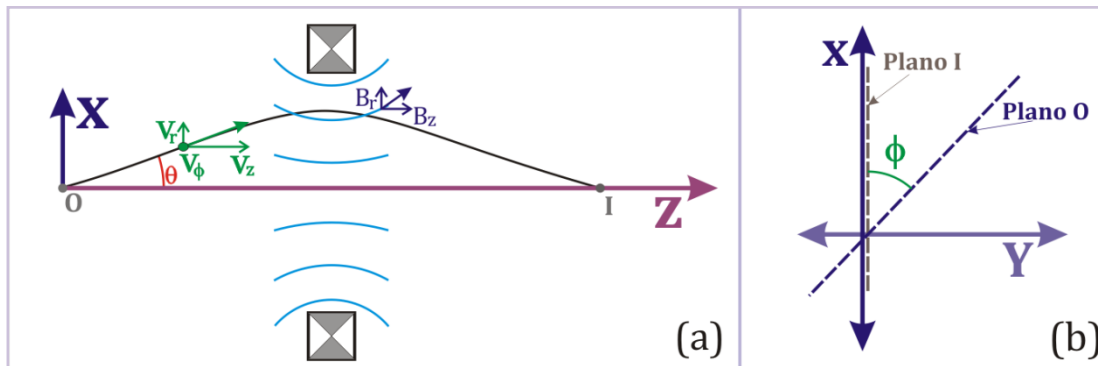
Con lo anterior la ecuación (2.2) puede ser reescrita en términos de  $F_z$ ,  $F_r$  y  $F_\phi$ , así:

$$F_{\phi} = -e(v_z B_r) + e(B_z v_r) \quad (2.4)$$

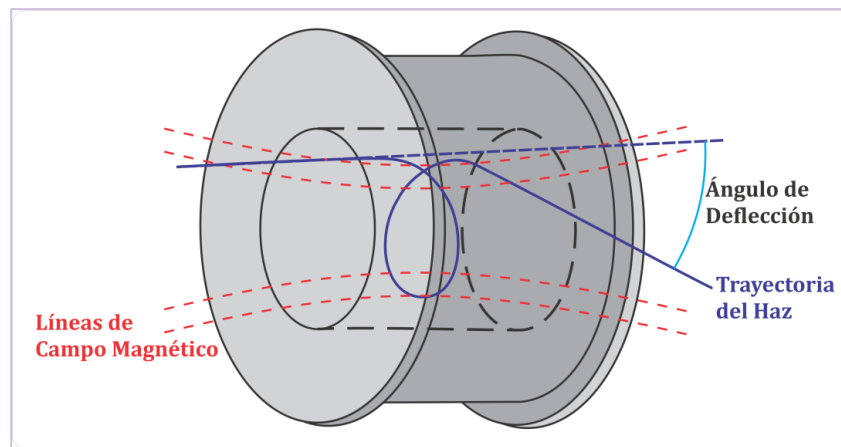
$$F_r = -e(v_{\phi} B_z) \quad (2.5)$$

$$F_z = e(v_{\phi} B_r) + e(B_z v_r) \quad (2.6)$$

El efecto de este campo magnético no uniforme sobre la trayectoria del electrón es análogo al efecto de una lente convexa sobre un haz de fotones, tal como se observa en la figura 2.7.

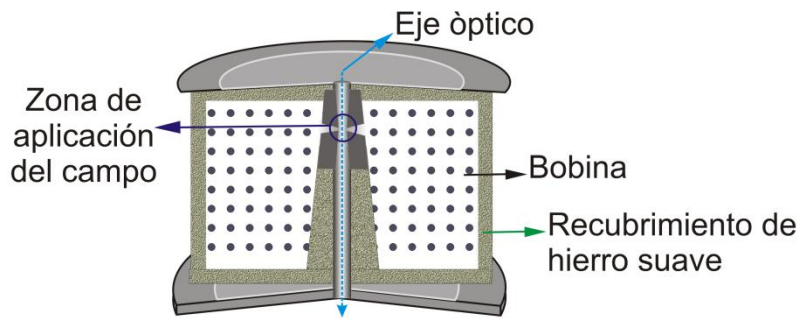


**Figura 2.6.**(a)Componentes vectoriales de la velocidad del electrón que parte de un punto O en el objeto y es afectado por el campo magnético de la lente. (b) inclinación del plano de vibración del electrón luego de pasar por la lente.



**Figura 2.7.**Lente magnética actuando sobre el haz de electrones.

Por cuestiones de diseño, en una lente magnética el campo se concentra en regiones muy pequeñas (figura 2.8), ya que un alto gradiente de campo magnético reduce la longitud focal de la lente y así los defectos de la misma.



**Figura 2.8.** Corte transversal de una lente magnética

En una lente óptica la longitud focal está determinada por el espesor de la lente y los radios de curvatura, en una lente magnética el parámetro análogo al espesor es el tamaño de la región afectada por el campo magnético.

#### **2.4. Formación de la imagen por lentes sin aberraciones.**

Como ya fue mencionado, para enfocar el haz de electrones la lente magnética emplea el campo magnético producido por una bobina a través de la cual pasa una corriente directa. No obstante esta corriente directa puede presentar inestabilidades debidas a problemas en la instrumentación, generando alteraciones en la uniformidad del campo. Como es claro, los electrones no estarán sometidos a una interacción uniforme con el campo, por lo que responderán tal como fotones atravesando lentes con diferentes distancias focales y, como consecuencia, habrá un desenfoque de la imagen formada. Una forma de minimizar este tipo de defecto es reducir la región de acción del campo magnético con una configuración de las lentes tal como se observa en la figura 2.8. Otra posibilidad es controlar las inestabilidades de la corriente por medio de circuitos dispuestos para tal fin.

Si se supone un campo uniforme en una lente magnética, la interacción de este campo con los electrones que lo atraviesan dependerá de la velocidad individual de estos electrones. Luego de ser acelerado desde la fuente, el haz de electrones es considerado como un conjunto de electrones con la misma velocidad, puesto que fueron acelerados por un mismo campo eléctrico.

En condiciones prácticas no se puede alcanzar un vacío absoluto en la columna del microscopio, por lo que algunos electrones pueden perder energía durante el trayecto y por consiguiente cambiar su velocidad, este inconveniente se minimiza entonces aumentando el vacío. La pérdida de energía de los electrones por interacción con la muestra es inevitable e indispensable para formar una imagen reconocible.

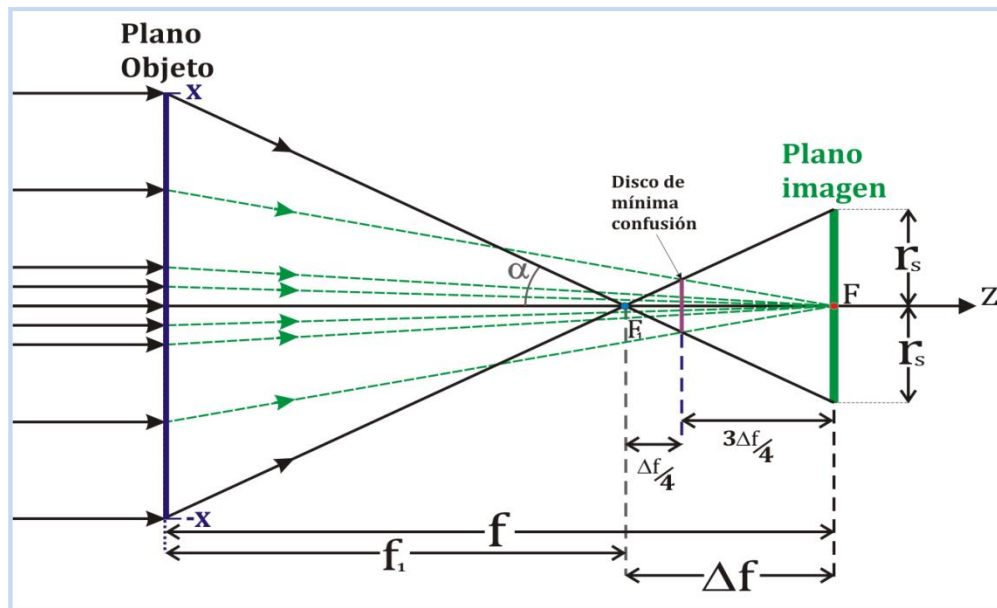
## **2.5 Defectos de las Lentes**

Las aberraciones en las lentes de vidrio actúan deformando las ondas electromagnéticas. Como ya fue mencionado, en el caso de un haz de electrones lo que se busca es desviarlo con respecto al eje óptico. En las lentes electrostáticas y magnéticas las aberraciones axiales (que dependen de la trayectoria del haz con respecto al eje óptico) que afectan el haz de electrones son, las *aberraciones esférica y cromática, astigmatismo y la coma*<sup>[2]</sup>.

### ➤ **Aberración esférica**

El propósito de enfocar es que un electrón que sale de un punto particular de la muestra llegue exactamente a su punto correspondiente en la imagen a formar. Lo anterior es el comportamiento ideal. La aberración esférica altera este comportamiento ideal: Si el campo magnético no es homogéneo, los electrones que viajan más alejados del eje óptico sienten una mayor fuerza que aquellos que pasan más cerca del eje. La longitud focal entonces es diferente para cada electrón y en consecuencia un electrón que parte de un punto en particular del objeto no es enfocado en un punto particular de la imagen sino en un círculo de radio  $\Delta r_s$  que rodea la posición ideal del punto en la imagen formada, tal como se muestra en la figura 2.9.

En la figura,  $\alpha$  es la apertura de y  $\Delta r_s$  es el radio del círculo de enfoque debido a la aberración, también conocido como “disco de confusión”.



**Figura 2.9.** Trayectoria de los rayos en una lente con aberración esférica, los rayos cercanos al eje óptico se enfocan en el punto F pero cuanto más lejos del eje se muevan otros electrones, estos serán enfocados cerca del punto F1, formando un disco de mínima confusión en el punto indicado.

Estos parámetros están relacionados por medio de la *constante de aberración esférica*  $C_s$ , de la forma

$$\Delta r_s = a^3 C_s \quad (2.5)$$

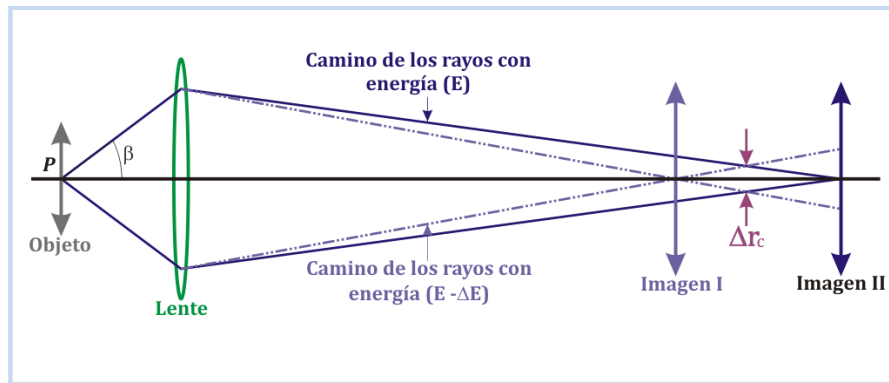
Típicamente esta constante tiene un valor entre 1mm y 2mm.

Cuando la imagen no está enfocada, los “rayos” o partículas que salen de un punto en particular del objeto llegan a cualquier punto dentro de un círculo que rodea el punto equivalente de la imagen ideal, este círculo es llamado *disco de confusión*.

### ➤ **Aberración Cromática**

La aberración cromática se produce debido a que no todos los electrones se mueven con la misma energía debido a pérdida inelásticas en su trayecto o por inestabilidad en

el campo eléctrico o magnético. En consecuencia, la longitud focal de la lente varía con la energía de cada electrón, dando nuevamente como resultado un efecto de aberración que se manifiesta con la aparición de un disco de confusión de radio  $\Delta r_c$  tal como se observa en la figura 2.10.



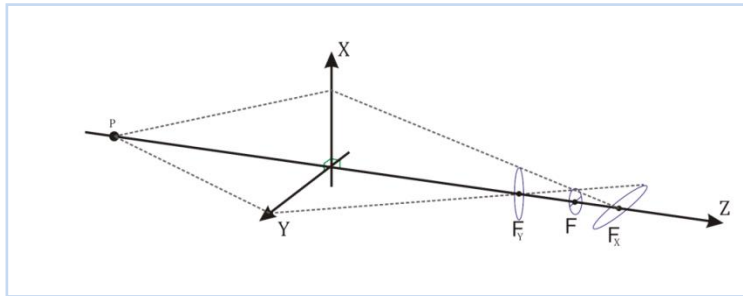
**Figura 2.10.** Formación de un disco de confusión: La longitud focal de la lente varía con la energía de cada electrón, el efecto es una aberración que se manifiesta con la aparición de un disco de confusión de radio  $\Delta r_c$  en el plano de la imagen.

En este caso, el radio del disco de confusión y la apertura de la lente están relacionadas con el cambio de energía de los electrones por medio de la siguiente expresión,

$$\Delta r_c = C_c \beta \frac{\Delta E}{E} \quad (2.6)$$

➤ **Astigmatismo.**

Este defecto en la lente se presenta cuando la lente tiene diferentes distancias focales dependiendo del plano de la trayectoria de los electrones. En el caso del microscopio electrónico el astigmatismo se manifiesta diferente en la imagen dependiendo de la lente en la que se está presentando, así, si el astigmatismo está en la lente condensadora el haz perderá coherencia, si está en la lente objetivo se reduce la resolución de la imagen drásticamente. El fenómeno se puede observar en la figura 2.11.



**Figura 2.11.** Astigmatismo, la distancia focal cambia con respecto al plano de vibración de la iluminación.

➤ **Coma.**

Finalmente, la aberración conocida como “coma” (*comatic aberration* o aberración comática) se produce cuando diferentes zonas circulares concéntricas de la superficie de la lente proporcionan aumentos diferentes de una imagen causando desplazamiento respecto al eje. El resultado es que el enfoque ya no se hará dentro de un círculo de confusión sino en una zona con forma de cometa.



## **CAPÍTULO III**

### **EL JEOL JEM 1200-EX**

#### **Parte I: Descripción General**



Como fué dicho en la introducción de este documento, la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca cuenta con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1200-EX fabricado por el Laboratorio de Óptica Electrónica de Japón (JEOL) y adquirido en el año 1989. Desde entonces ha brindado apoyo a diferentes grupos de investigación de la Universidad del Cauca, ha sido una herramienta útil en el diagnóstico de enfermedades tratadas en la Unidad de patología del Hospital Universitario San José y ha prestado servicios a grupos de otras universidades del país (Universidad de Antioquia, Universidad de Caldas, Centro de investigación del café –Cenicafé, entre otros).

En este capítulo se describirá en detalle las principales características técnicas del MET JEOL JEM 1200-EX, (MET).

### **3.1 Descripción del MET**

El MET, ubicado en la unidad de microscopia electrónica de la Universidad del Cauca (UME) posibilita obtener imágenes con resolución miles de veces mayor que un microscopio óptico, permitiendo revelar características morfológicas de la muestra con resolución nanométrica. El funcionamiento de un microscopio se fundamenta en una fuente de iluminación, un sistema de manipulación de la muestra, y un sistema de formación de la imagen obtenida de la muestra, por tanto el funcionamiento de este instrumento esta fuertemente ligado al de los dispositivos y sistemas que lo componen. Cada una de las partes del MET juega un papel importante en su funcionamiento y es absolutamente indispensable que todos los sistemas trabajen de forma sincronizada. En la figura 3.1 se presenta una fotografía de este microscopio.

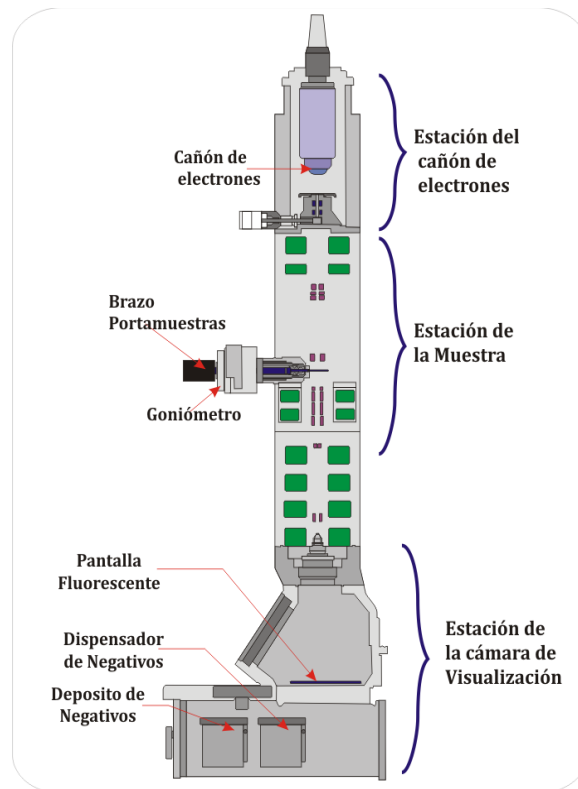
Para facilitar la comprensión del funcionamiento del MET, la columna se analizará en tres secciones sobre las que se hará el primer estudio: la estación del cañón de electrones, la estación de la muestra y la estación de la cámara de visualización, tal como se observa en la figura 3.2.

Unido a lo anterior, el funcionamiento del MET también depende de ciertas condiciones instrumentales y por tal motivo los sistemas se pueden analizar de forma

separada como sigue, *Sistema de Iluminación, Sistema de Vacío, Sistema Óptico, Sistema de Refrigeración y Sistema de Aire Comprimido.*



**Figura 3.1.** Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM 1200-EX de la Unidad de Microscopia electrónica de la Universidad del Cauca.



**Figura 3.2** Vista transversal de la columna del MET dividida en estaciones

### 3.3.1 Configuración del MET.

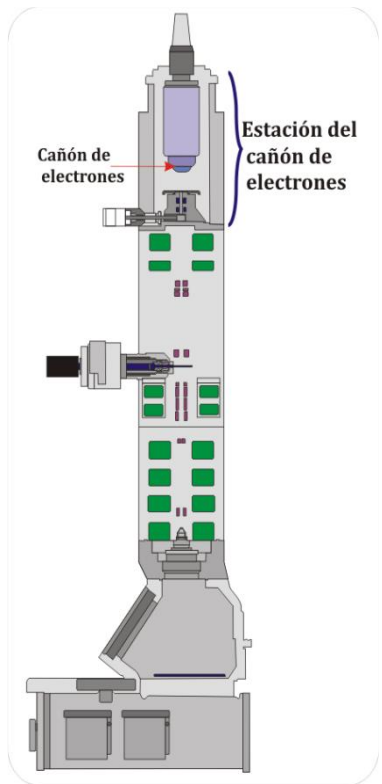
Según el principio físico de funcionamiento, el MET usa un filamento de tungsteno para producir un haz de electrones que luego es enfocado por lentes electromagnéticas haciendo que los electrones interactúen con una muestra para producir una imagen de la misma sobre una pantalla de fósforo, ubicada en la base de la columna, así pues, debe garantizarse que el proceso ocurra de la forma descrita o al menos de la forma más fiel posible. A continuación se describen las secciones y los sistemas que componen el MET.

➤ *Sección Uno: Estación del Cañón de Electrones.*

La primera estación alberga al cañón de electrones que consta de un filamento de tungsteno que al ser calentado produce a su alrededor una nube de electrones que luego es acelerada para producir el haz de electrones usado como iluminación del MET. En la figura 3.3 se muestra la ubicación de sistema de iluminación en la columna, y fotografías del cañón de electrones y del filamento mencionado. El proceso de producir la iluminación comienza al aplicar un voltaje al filamento de tungsteno que provoca su calentamiento y, como consecuencia, la producción de una nube de electrones por efecto termoiónico. El filamento se ubica dentro de una estructura metálica llamada unidad Wehnelt<sup>4</sup> conectada a un potencial negativo (la configuración eléctrica del cañón se muestra en la figura 3.8). Antes de salir de la estación del cañón el haz de electrones impulsado por el campo eléctrico pasa por un ánodo ubicado en la base de la estación donde se encuentra el orificio de salida del haz, bajo el ánodo el cañón cuenta con dos bobinas que sirven para corregir posibles desviaciones o inclinaciones del haz producido.

---

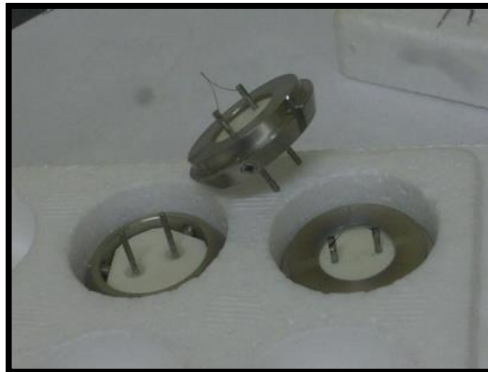
<sup>4</sup> Una unidad (cilindro) Wehnelt es un electrodo en El montaje de cañones de electrones de algunos dispositivos termoiónicos, usados para enfocar y controlar el haz de electrones. Su nombre se debe a Arthur Rudolph Berthold Wehnelt, físico alemán que lo inventó durante los años 1902 y 1903.



(a)



(b)

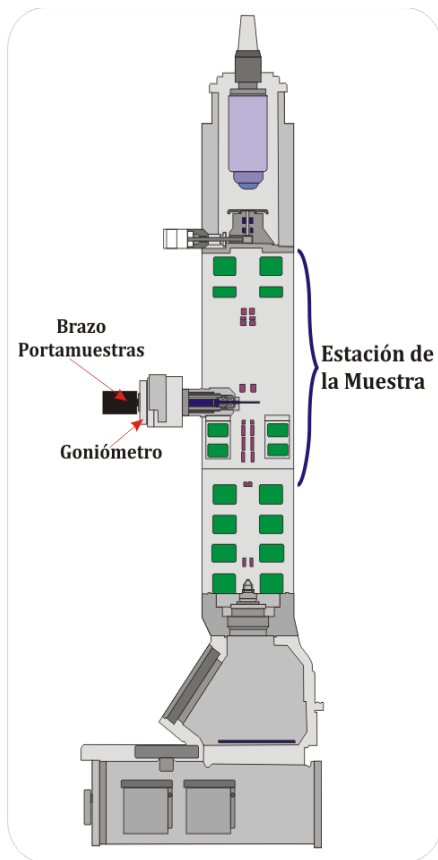


(c)

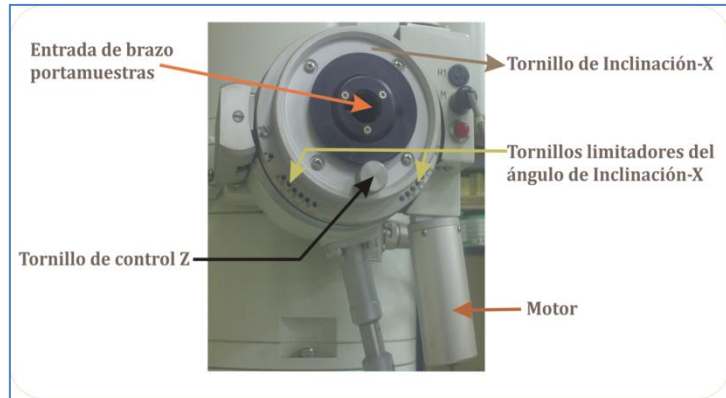
**Figura 3.3.** Sección 1. Estación del cañón de electrones del MET. (a) Ubicación de la estación en la columna; (b) fotografía del cañón de electrones; (c) Filamento de tungsteno.

➤ *Sección Dos: Estación de la muestra.*

En sección dos de la columna se ubica la muestra y los dispositivos necesarios para su manipulación tal como se muestra en la figura 3.5, en caso de ser necesario girarla el MET cuenta un goniómetro al que se le pueden acoplar un motor. La muestra es montada en una rejilla metálica de 3 mm de diámetro que se asegura a un brazo porta muestras que luego es introducido a la columna para atravesar la rejilla en el camino del haz de electrones.



(a)



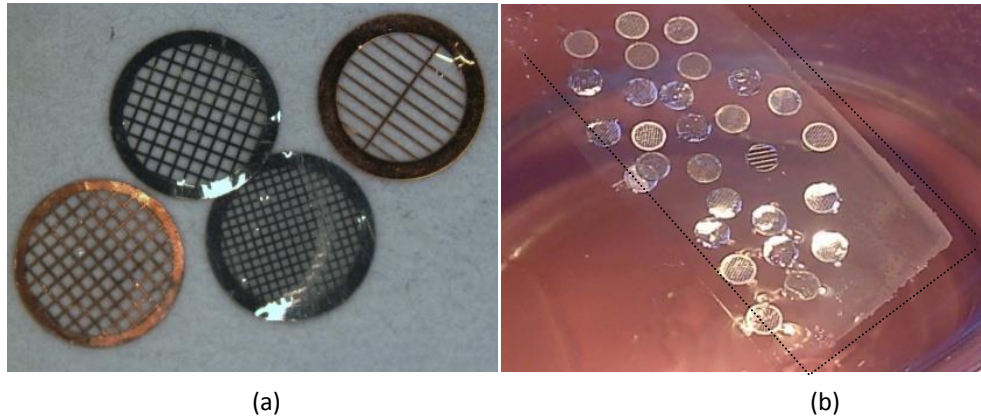
(b)



(c)

**Figura 3.5.** Sección 2. Estación de la muestra. (a) Ubicación en la columna; (b) fotografía de la entrada del goniómetro; (c) Brazo portamuestras.

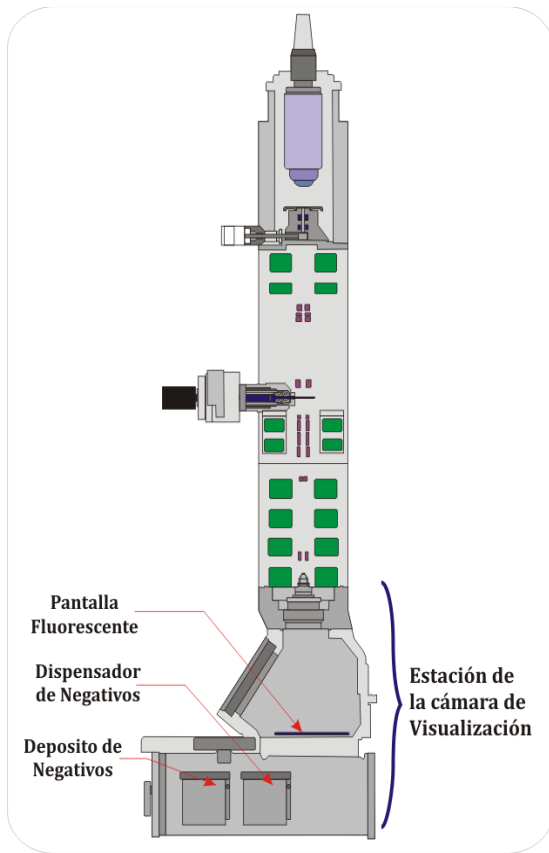
En general este brazo tiene capacidad para introducir dos muestras y la elección de la muestra que es analizada puede hacerse manipulando el selector de muestra del MET (descrito en el anexo 1). Las rejillas circulares sobre las que se deposita la muestra son de Niquel o Cobre y previamente son sometidas a un proceso para cubrir las con una membrana de material electrónicamente transparente (Formvar) sobre la que se sostiene la muestra. En la figura 3.5 se presentan fotografías de: la rejilla 3.6a y de la membrana con las rejillas, 3.6b



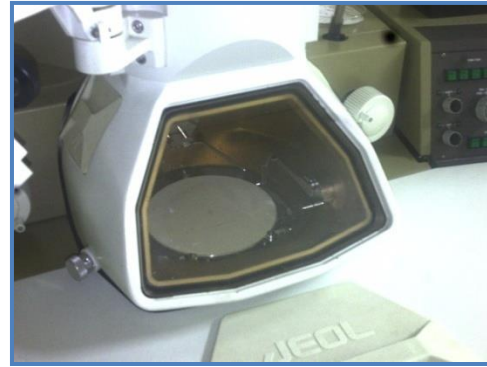
**Figura 3.6.** Rejillas porta-muestras: (a) Rejillas de cobre y níquel, (b) Rejilla con membrana.

➤ *Sección tres: Estación de la cámara de visualización.*

En la tercera estación se encuentra el sistema de formación de la imagen que incluye la pantalla fluorescente de fósforo sobre la que se proyecta la imagen obtenida, y los negativos usados para registrar las imágenes. La pantalla de fósforo es sensible a la luz visible y debe mantenerse cubierta manteniendo tapada la ventana de visualización para disminuir el desgaste y prolongar su vida útil ya que la pantalla es el dispositivo que usa el operario para observar directamente la imagen formada y prepararla para ser registrada en los negativos. El MET cuenta con un sistema automático de adquisición y registro de las imágenes que puede ser programado con tiempos de exposición de las películas determinados por el operario. Las cajas metálicas que contienen los negativos deben ser sometidas a un proceso minucioso de limpieza y el operario debe asegurarse de que no tengan rastros de humedad puesto que cualquier contaminación provoca alteraciones en las condiciones de vacío. Una de las cajas que se insertan en el MET se llena con negativos sin usar y es de donde el sistema extrae el negativo sin usar para ser expuesto al haz mientras que la segunda caja recibe del sistema los negativos usados. La figura 3.7 muestra la ubicación de la estación en la columna y fotografías de la pantalla de fosforo y las cajas donde se introducen los negativos



(a)



(b)



(c)

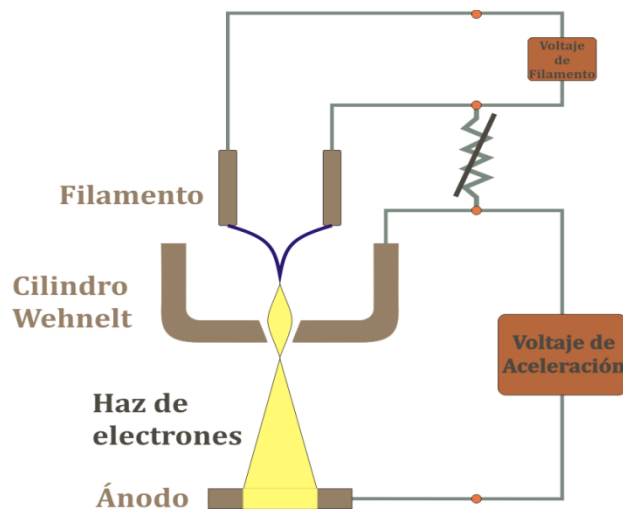
**Figura 3.7.** Sección 3. Estación de visualización. (a) Ubicación en la columna; (b) fotografía de la pantalla de Fósforo; (c) Ubicación de las cajas de los negativos

Como se mencionó anteriormente deben cumplirse condiciones instrumentales específicas para que el MET tenga buen funcionamiento y los resultados obtenidos tengan la mayor calidad posible. El MET implementa sistemas integrados que permiten cumplir con dichas condiciones, los sistemas que hacen posible el funcionamiento del MET se describen a continuación.

➤ **Sistema de Iluminación.**

El sistema de iluminación del MET está compuesto por *el cañón de electrones* y *las lentes condensadoras* encargados de producir y corregir el haz respectivamente. El

cañón de electrones, ubicado en la parte más alta de la columna, consta de un filamento de tungsteno, una estructura metálica conocida cilindro Wehnelt, el ánodo, dos bobinas que corrigen desplazamiento e inclinación del haz y las lentes condensadoras. En el interior del cañón el un filamento en forma de V de tungsteno es usado como fuente de electrones puesto que al ser un metal el tungsteno contiene iones positivos y electrones libres que pueden ser extraídos del metal en un espacio vacío por la aplicación de corriente directa, que provoca calentamiento del filamento hasta que los electrones ganan la suficiente energía para separarse del filamento y formar una nube alrededor del material en un proceso conocido como efecto termoiónico<sup>5</sup>. La cantidad de energía necesaria para provocar que los electrones abandonen el material se denomina función trabajo del material y aunque la del tungsteno es relativamente alta respecto de otros materiales presenta una buena producción de electrones por debajo de su temperatura de fusión (3,653 K). Tal como se muestra en la figura 3.8 el cilindro Wehnelt que cubre el filamento está conectado a un potencial levemente menor y tiene un orificio circular que permite que los electrones salgan de forma adecuada antes de atravesar el ánodo influenciados por el voltaje de aceleración aplicado.

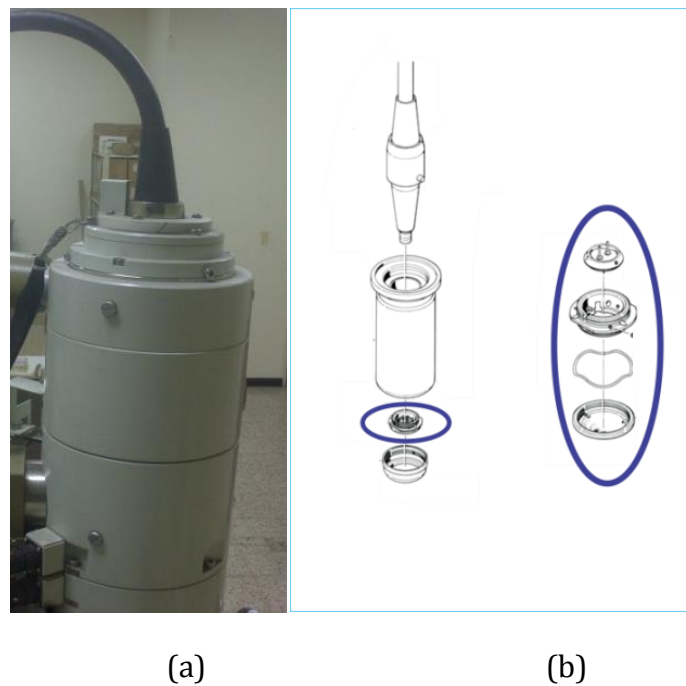


**Figura 3.8.** Configuración eléctrica del cañón de electrones<sup>[7]</sup>.

<sup>5</sup>A temperaturas elevadas, la energía cinética de los electrones libres aumenta y muchos superan la atracción de los núcleos y atraviesan la superficie del metal pasando al espacio circundante. Este tipo de liberación de electrones de un metal se conoce con el nombre de "emisión termoiónica" o "efecto termoiónico"



La velocidad de los electrones, y por consiguiente su longitud de onda, varía en función del voltaje aplicado para acelerarlos y determina el límite de resolución del MET.



**Figura 3.11.** (a) Ubicación del sistema de Iluminación<sup>[7]</sup> (b) entrada del cable de alto Voltaje, (la región en azul corresponde a la posición del filamento)

El tiempo de vida del filamento oscila entre 25 horas y 200 horas aunque depende de las condiciones de trabajo y puede verse afectado por

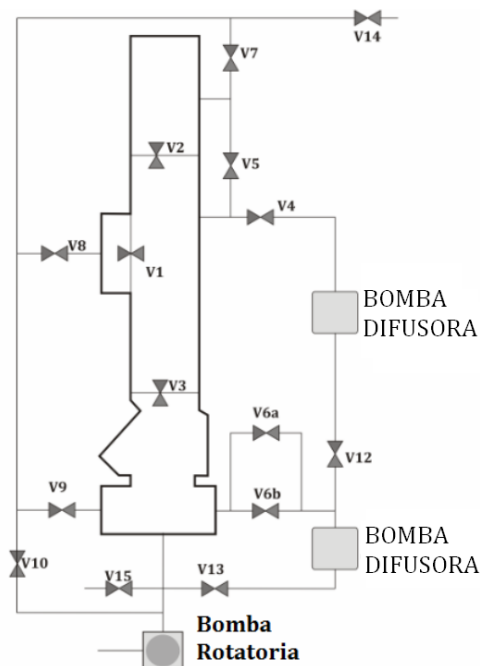
- Sobre-saturación.
- Descargas de alto voltaje causadas por contaminación en las estación del cañón ,
- Fallas en el sistema de vacío
- Fugas de aire desde el exterior de la estación del cañón.

El MET cuenta con *dos lentes condensadoras*, la primera define el tamaño del punto mas pequeño de iluminación sobre la muestra reduciendo el diámetro del haz que proviene del cañón de electrones de aproximadamente 50 micras a un rango variable entre 20 micras a 1 micra. La segunda lente condensadora regula la cantidad de iluminación que cae sobre la muestra ampliando o disminuyendo el diámetro del haz (dispersándolo o

concentrándolo respectivamente) durante la operación del MET. La función principal de las lentes condensadoras es controlar de forma precisa la cantidad de radiación que interactúa con la muestra.

### ➤ Sistema de vacío

Puesto que los electrones deben desplazarse con la menor pérdida de energía posible (para evitar aberración cromática en las lentes), el MET contiene un sistema de vacío que cuenta con un conjunto de válvulas electroneumáticas, que separan las estaciones de la columna, para realizar la evacuación de aire y asegurarle al haz de electrones un camino libre de contaminación. Estas válvulas son controladas automáticamente por sistemas de control incluidos en el MET usando como variable de realimentación la medida de sensores de presión ubicados en las estaciones a evacuar. El vacío necesario para el funcionamiento del MET se hace a través de una bomba rotatoria y dos bombas difusoras que terminan su trabajo principal al llevar la columna a una presión de trabajo de aproximadamente  $0.5 \times 10^{-5}$  Pa y se encargan de mantenerla alrededor de ese valor. En la figura 3.8 se presenta el esquema del sistema de vacío del MET.



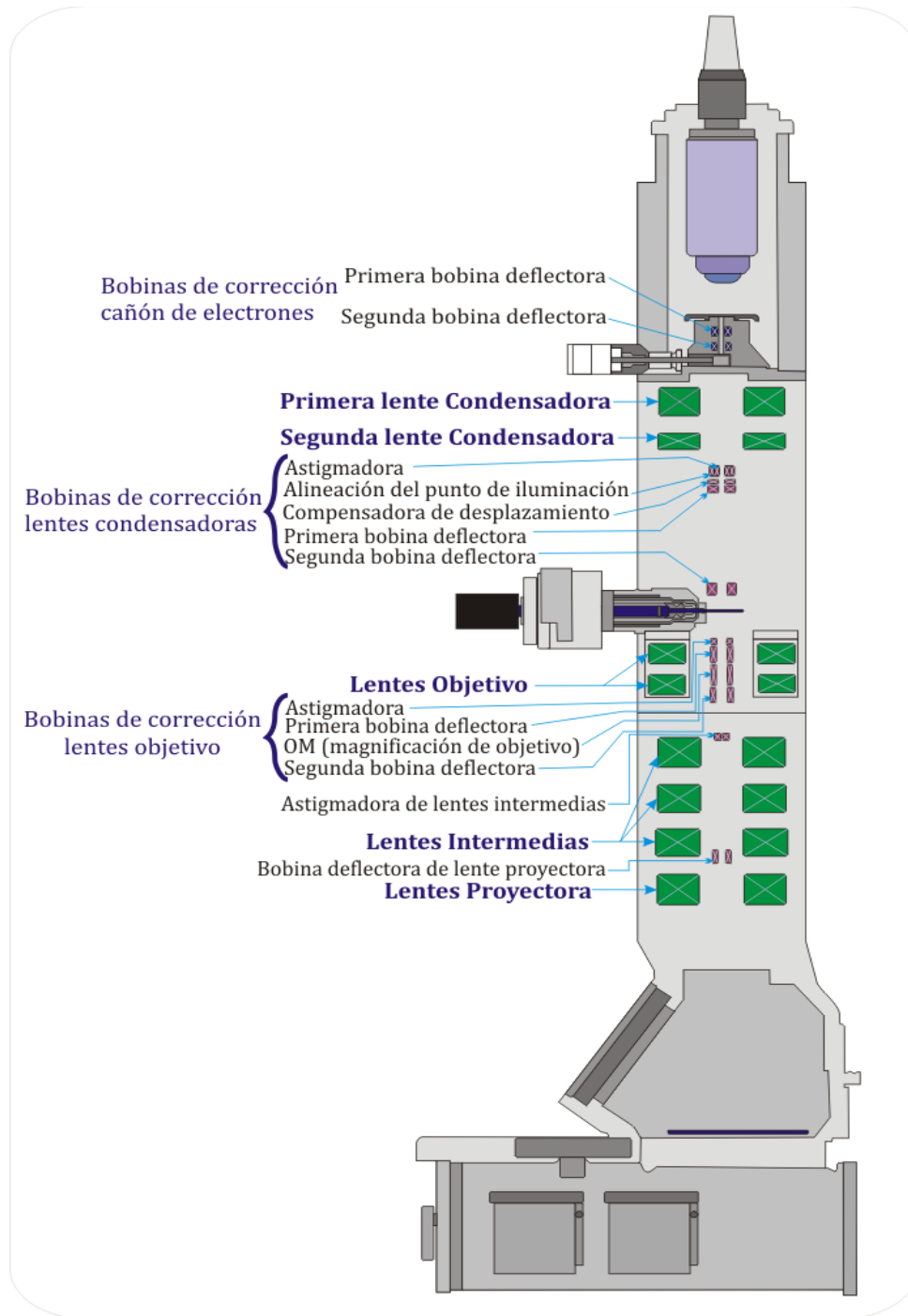
**Figura 3.8.** Configuración del sistema de vacío del MET JEOL, JEM 1200-EX. Las estructuras en forma de corbatín representan válvulas que aíslan las estaciones entre ellas y del ambiente.

El suministro de aire comprimido al sistema de vacío del MET es usado entre otras cosas para cambiar el estado de las válvulas de cerrada a abiertas y viceversa. El alto vacío producido es necesario para evitar el desgaste del filamento durante su uso además de permitir un camino libre al haz de electrones. Durante el proceso de cambio de filamento, el MET imprime aire a la estación que contiene al cañón aislando las otras estaciones. Las bombas difusoras evaporan aceite que luego se condensa en la parte superior de la bomba que se mantiene fría gracias a la circulación continua de agua fresca proveniente del recirculador de agua con el que cuenta el MET.

➤ **Sistema Óptico.**

El MET cuenta con 13 bobinas para corregir defectos del haz y 8 lentes electromagnéticas ubicadas a lo largo de la columna entre las que se encuentran las ya mencionadas lentes condensadoras cuyo propósito es asegurar que sobre la muestra caiga un haz alineado y coherente. Luego de atravesar la muestra el haz dispersado ingresa a las lentes objetivo que producen la primera imagen del espécimen y después la imagen mencionada pasa por lentes intermedias para finalmente ser proyectada sobre la pantalla de fósforo por la lente proyectora ubicada en la parte baja de la columna. En la figura 3.9 se presenta un esquema de la ubicación de las lentes electromagnéticas y bobinas en la columna del MET JEM 1200-EX.

Las bobinas usadas para corregir el haz de electrones en el MET se usan para contrarrestar aberraciones como el astigmatismo posibles desvíos de la trayectoria del haz respecto al eje óptico. El control de la intensidad del campo aplicado sobre el haz se hace mediante la manipulación de las corrientes que alimentan a las bobinas, esto gracias a potenciómetros ubicados en el panel de control del instrumento. El paso de corriente a través de las lentes y bobinas provocan calentamiento de las mismas por lo que el recirculador de agua mencionado anteriormente también provee un flujo constante de agua alrededor de las lentes que reduce su temperatura.



*Figura 3.9. Sistema óptico del MET JEOL JEM 1200 EX.*

➤ **Sistema de refrigeración**

El MET dispone de un sistema de recirculación de agua que mantiene algunos de los componentes dentro de la temperatura de trabajo. Las bombas difusoras del sistema

de vacío necesitan un suministro de agua fría y las lentes electromagnéticas se calientan debido al flujo de corriente eléctrica que pasa a través de ellas, por lo que el recirculador del MET suministra un flujo constante de agua fresca como sistema de refrigeración. Para ello, una manguera inyectora el agua al MET por medio de una entrada ubicada en la parte trasera del instrumento.

El agua fresca pasa por mangueras que la distribuyen para la refrigeración de las lentes, la refrigeración de la unidad de alimentación de las lentes y suministrando el resto a las bombas difusoras que funcionan con procesos de evaporación y condensación de aceite.

El agua dentro del MET se mueve a través de mangueras y tubos metálicos que están en contacto directo rodeando los componentes de los que el agua absorbe calor. El agua caliente es llevada a un intercambiador térmico ubicado en la parte exterior de la habitación y que consiste en un tanque de agua fría en el que está sumergido un serpentín metálico conectado a un radiador que disipa el calor, tal como en un refrigerador.

El sistema de recirculación de agua solo se desconecta del MET durante un proceso conocido como BAKE OUT en el que la columna se deja calentar para eliminar contaminación en las paredes internas.

#### ➤ **Sistema de Aire comprimido**

El MET cuenta con un compresor que suministra aire con una presión de aproximadamente 4.5 kg/cm<sup>2</sup>. El aire comprimido cumple funciones específicas en los sistemas de vacío y refrigeración; En el sistema de vacío se encarga de cerrar y abrir las válvulas que separan las estaciones a evacuar. En el sistema de refrigeración el aire del compresor se encarga de evitar la acumulación de agua residual en el sistema de refrigeración de las lentes.

### 3.3.2 Componentes externos.

Además de las partes mencionadas, externamente el MET cuenta con varios componentes: el tanque de alto voltaje, la fuente de alimentación, el compresor, la bomba rotatoria, todos conectados directamente al MET. Hay otro elemento que, a pesar de no necesariamente estar conectado, desempeña un papel importante en el proceso de funcionamiento: el desecador, en el que se depositan las películas fotográficas antes de introducirlas al MET con el fin de eliminar al máximo contaminantes que puedan afectar el vacío de la columna. En la figura 3.10 se observa una fotografía de estos componentes.



(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 3.10.** Componentes externos al MET: (a) Fuente de poder, (b) Tanque de alto voltaje, (c) Compresor, (d) Bomba rotatoria.

### **3.3.3 Adquisición de la imagen.**

El MET cuenta con un compartimiento ubicado justo debajo de la pantalla de fósforo (figura 3.7) cuya función es albergar cajas metálicas que contienen los negativos en los que se imprime la imagen. Estas cajas tienen una capacidad de hasta 25 negativos que son utilizados uno a uno, para lo cual el MET usa un sistema de exposición automática con tiempos de exposición fijos o variables. En el proceso de adquisición de la imagen la pantalla de fósforo se levanta automáticamente dejando expuesta el negativo que contiene una emulsión de bromuro de plata que reacciona a los electrones provenientes de la muestra. Una vez impresa la imagen en el negativo, pasa dentro de la misma recámara a otra caja que contiene los negativos usados. Es recomendable extraer la caja de negativos solo cuando todos hayan sido usados, ya que el proceso provoca una pérdida de vacío que tarda varias horas en recuperarse.

#### **✓ Revelado**

El proceso de revelado comienza con la extracción de las cajas contenedoras de las películas del MET para ser llevadas a un cuarto oscuro en el que sufren el tratamiento de revelado de la imagen, cuyo primer paso consiste en sumergir la película en un agente químico revelador que desprende del negativo el bromuro de plata que no reaccionó (no fue expuesto), proceso que lleva de 3 a 5 minutos. Después se sumerge en agua para detener el proceso de revelado y posteriormente se sumerge en una sustancia que sirve como fijador de la imagen obtenida. Por último se hace pasar la película por agua corriente para eliminar el exceso de las sustancias involucradas en el proceso; el resultado es un negativo de la micrografía obtenida en el MET.

### **3.1.4 Preparación de las muestras**

Las muestras para el MET sufren diferentes procesos de preparación que dependen de su naturaleza. En principio, como se trata de una interacción con electrones, la muestra debe ser de carácter conductor. No obstante, es posible analizar muestras no conductoras mediante preparaciones específicas, así:

✓ Muestras biológicas:

No son conductoras, por lo que no presentan interacción con el haz de electrones. Se hace necesario entonces someterlas a un tratamiento que comienza por la inmersión de la muestra en glutaraldehído<sup>6</sup> para detener el proceso natural de degradación celular, este paso es hecho por el especialista encargado de la extracción de la muestra. Cuando la muestra llega a la unidad de microscopía electrónica se deshidrata gradualmente sumergiéndola en alcohol con diferentes concentraciones. Posteriormente se le aplica tetróxido de osmio<sup>7</sup> como posfijador y como primer agente que aporta contraste a la muestra. Para mayor “tinción” se fijan a la muestra metales pesados con acetato de uranilo y citrato de plomo. La última parte del proceso de preparación para la muestra biológica es colocar la muestra en una resina que funciona como matriz de soporte para llevar a la muestra a un ultramicrotomo con el que se hacen cortes ultrafinos (40 nm-80 nm). Los cortes se colocan sobre la rejilla portamuestras y la muestra biológica esta lista para ser llevada al MET.

✓ Materiales en polvo:

Debe hacerse una molienda previa que disminuya al máximo el tamaño de partícula del polvo para luego disolverlo en etanol y aplicar la muestra como gotas sobre rejillas, tal como se observa en la figura 3.6b. Luego de la evaporación del etanol se obtienen partículas del polvo adheridas a la membrana que recubre la rejilla. Ya que el proceso de evaporación del etanol es muy rápido (10 min – 15 min), el tiempo de preparación de esta muestra depende casi en su totalidad del tiempo que lleve el proceso de molienda.

---

<sup>6</sup>El Glutaraldehído es un compuesto químico de la familia de los aldehídos que se usa principalmente como desinfectante de equipos médicos y odontológicos así como de laboratorio. Al sumergir la muestra en una solución de Glutaraldehído se detiene el proceso de descomposición celular.

<sup>7</sup>El tetróxido de osmio, OsO<sub>4</sub>, es un agente de tinción ampliamente usado para proveer contraste a la imagen observada en el MET.





# **CAPÍTULO IV**

## **EL JEOL JEM 1200-EX**

### **Parte II: Bitácora de Mantenimiento**

El microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM 1200EX fue adquirido por la Universidad del Cauca en el año de 1989, por lo que ha estado en continuo funcionamiento por 23 años. Como es de esperar, a pesar de ser un instrumento robusto, durante este período de tiempo el MET ha sufrido una serie de averías y consecuentes reparaciones. Estas reparaciones han estado a cargo del ingeniero electrónico Jaime Díaz, quién tuvo el cuidado de registrar los detalles de las averías y del proceso de reparación. Las fallas han estado concentradas especialmente en el sistema de vacío, en el tanque de alto voltaje, en el sistema de refrigeración, en el cañón de electrones y en algunos componentes circuitales.

Las actividades de mantenimiento en la actualidad no son programadas y no son periódicas, siendo que se hacen si es necesario y solo si el equipo presenta anomalías en su funcionamiento. El MET es un instrumento de uso diario y constante, lo que supone también un diario y constante desgaste de sus componentes. Las operaciones de mantenimiento son necesarias e indispensables para un correcto funcionamiento del equipo y para identificar posibles daños degenerativos de los sistemas

Aunque algunas partes del MET no son sometidas a esfuerzos durante su operación, existen otras que son objeto de manipulación diaria y por lo tanto son susceptibles a presentar averías por desgaste o mal manejo. Los cuidados son diferentes dependiendo de la ubicación del componente ya que cualquier manipulación inadecuada de componentes en contacto con la columna puede alterar las condiciones del vacío. Así pues, para el mantenimiento de los componentes que hacen parte de la columna se debe tener especial cuidado con la limpieza y la manipulación, a diferencia de los componentes externos, para los que la limpieza no es la acción más relevante. Los componentes externos conllevan otros riesgos y condiciones que también deben seguirse al pie de la letra según los manuales, ya que todos los componentes forman parte de un sistema integrado en la operación del MET y por lo tanto un daño irreparable en uno de sus componentes significaría que el resto del equipo tampoco pueda funcionar, por lo que no se le debe restar importancia a las labores de mantenimiento de los componentes externos.

Dependiendo del componente que sea objeto de mantenimiento los cuidados deben ser específicos:

- ✓ la manipulación de la fuente de alimentación conlleva riesgo de descargas eléctricas.
- ✓ El tanque de alto voltaje tiene componentes aislados herméticamente e inmersos en gas freón para evitar descargas eléctricas, evitar las fugas de gas es

indispensable puesto que dicho gas es perjudicial para la salud y el medio ambiente.

- ✓ El nivel de aceite de la bomba rotatoria encargada de iniciar el vacío debe ser revisado constantemente, pues tiene un nivel mínimo para que el funcionamiento sea adecuado.
- ✓ El sistema de recirculación de agua también debe ser monitoreado constantemente para identificar potenciales daños degenerativos (como corrosión) puesto que se encuentra a la intemperie.

El mantenimiento de componentes externos depende de las condiciones de funcionamiento del componente y para algunos deben realizarse solo por personal certificado y experimentado en tal labor. Las actividades correspondientes a las principales labores de mantenimiento se consignan en el anexo A1: Rutinas de Mantenimiento.

En este capítulo se consignan los aspectos relevantes del proceso de mantenimiento al que ha sido sometido el MET con el fin de contar con un documento que sirva de apoyo a futuros miembros de personal de mantenimiento del microscopio electrónico de transmisión de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca. La información fue obtenida durante el proceso de pasantía en el que se tuvo tanto la oportunidad de trabajar al lado del experto en este tema, el ingeniero Jaime Díaz en las diferentes reparaciones, como estudiar los manuales del instrumento.

## **4.1. Apuntes de Mantenimiento**

### **4.1.1. Sistema de Vacío**

El sistema de vacío del MET consta de un conjunto de componentes dispuestos para evacuar el aire de la columna y así asegurar un camino libre al haz de electrones. Aunque el sistema es robusto y ha funcionado bien desde la fabricación del instrumento, es necesario establecer un cronograma de mantenimiento periódico de sus componentes con el fin de asegurar una mayor vida útil al mismo.

El sistema consta de tres bombas de vacío, a saber, una rotatoria, y dos bombas difusoras, encargadas de evacuar estaciones separadas por un total de 17 válvulas que sellan el paso de aire y mantienen separadas las estaciones y las bombas de vacío a demás de aislar el sistema del ambiente. El estado de las válvulas es normalmente cerradas y son abiertas automáticamente según la secuencia de vacío valiéndose de aire comprimido.

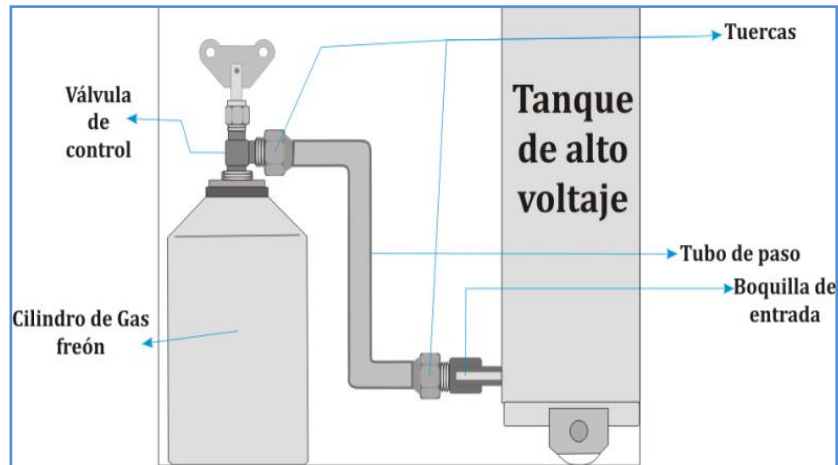
El sistema contiene empaques en las uniones entre componentes llamados O-RINGS (anillos de goma) que tiene como objetivo aislar el ambiente interno del externo, no obstante es necesario tener cuidado durante su manipulación y limpieza ya que alteraciones en su forma o rayones pueden ser causantes de fugas. Esta limpieza deberá hacerse con un tipo de tejido que no contamine y embebido en acetona. Algunos O-ring como el de la puerta de la recámara de las películas fotográficas y los del sistema de portamuestras son sometidos a mayor esfuerzo durante las actividades de operación del MET por lo que se recomienda una limpieza constante y periódica, Para los demás O-Rings la limpieza se hará en caso de detectar fuga, ya que por su ubicación son de difícil acceso.

También las bombas de vacío deben ser objeto de constante revisión por parte del personal para garantizar las condiciones necesarias para su buen funcionamiento. El nivel de aceite de la bomba rotatoria debe estar por encima de un mínimo nivel establecido y las bombas difusoras del MET han tenido que ser reparadas al presentarse fallas en la resistencia que calienta el aceite del que hacen uso.

#### **4.1. 2. Tanque de alto voltaje**

El tanque de alto voltaje recibe de la fuente de alimentación una tensión de 120 V; mediante el uso de transformadores y circuitos resonantes la amplitud de este voltaje es elevada hasta el valor deseado (del orden de los kV).

Los circuitos encargados de elevar el voltaje se encuentran inmersos en un gas freón para reducir la posibilidad de descargas eléctricas entre sus componentes. Este gas debe ser reemplazado en caso de que la presión indicada en el medidor del tanque esté por debajo de su valor de trabajo. La figura 4.1 muestra el contenedor del gas y la herramienta usada para su relleno. Es importante tener en cuenta que la fuga del gas puede causar efectos adversos en la salud de las personas expuestas y contaminación ambiental.



**Figura 4.1** contenedor de gas freón y herramienta de cambio del gas.

Una interferencia en el tanque de alto voltaje puede ocasionar defectos en la imagen adquirida y cualquier manipulación del tanque y sus componentes debe ser hecha por personal certificado para tal fin.

#### **4.1.3. Sistema de refrigeración**

El sistema de refrigeración mantiene a los componentes susceptibles de calentarse en temperaturas dentro de sus rangos de trabajo. La refrigeración se hace mediante el flujo constante de agua impulsada por un recirculador que mantiene el agua en un ciclo en el que, después de pasar por los componentes calientes, es llevada a un intercambiador térmico, que cuenta con un radiador que disipa al el calor absorbido al ambiente.

Aunque el sistema de refrigeración es externo al MET, como medida de autoprotección los sistemas de control del instrumento no permiten que se encienda si los sensores encargados no detectan la presencia del flujo de agua, por lo tanto es necesario garantizar el correcto funcionamiento del sistema de refrigeración.

Ya que el mecanismo principal del sistema de refrigeración está a la intemperie, acumula polvo y material biológico (insectos), además de sufrir procesos de corrosión en algunos de sus componentes. Por lo anterior, se requiere de un monitoreo constante y un mantenimiento periódico, en lo posible, cada tres meses.

#### **4.1.4 Proceso de cambio de filamento**

Como ya se mencionó, la fuente de iluminación del MET es un filamento de tungsteno ubicado en la parte superior de la columna. Su estructura sufre un continuo desgaste

que se traduce en una vida media útil de aproximadamente 200 horas si su uso es continuo y en condiciones de mínima saturación.

Con el uso continuo el filamento sufre un proceso de desgaste que lo lleva a romperse y es indispensable reemplazarlo. El cambio de filamento es el único procedimiento invasivo absolutamente necesario puesto que el filamento está ubicado en el interior de la columna, razón por la cual debe hacerse en condiciones de extrema limpieza. El procedimiento para su reemplazo (detallado en el Anexo A1) debe ser seguido al pie de la letra puesto que el mal manejo de los componentes puede generar daños irreparables en piezas cuyo repuesto puede ser costoso o difícil de conseguir en el mercado.

#### **4.1.5 Componentes Circuitalos**

Gran parte del espacio en el cuerpo del MET es dedicado a las tarjetas y circuitos encargados del control de los procesos, la manipulación de dichos circuitos debe hacerse con el mayor cuidado (tomando las tarjetas por los bordes, evitando tocar los circuitos y de ser posible con guantes antiestática); su limpieza periódica es necesaria para asegurar el correcto funcionamiento y reducir el riesgo de descargas eléctricas.

Cabe resaltar que muchas de las tarjetas están diseñadas para fines específicos, así que la falla en un sistema en particular también se puede asociar al posible fallo de la tarjeta encargada del sistema en cuestión y debido a que muchas de las conexiones de las tarjetas son similares hay que poner especial atención durante su manipulación para evitar una mala conexión, que se traduciría en el mal funcionamiento del equipo.

#### **4.1.6 Manipulación de Películas Fotográficas**

Para la adquisición de una buena imagen ante todo es necesario una correcta manipulación de la película fotográfica, lo que implica una limpieza del contenedor de las películas, que posteriormente será llevado a un desecador por alrededor de 24 horas para eliminar humedad. Para ubicar el contenedor en el MET es necesario abrir la puerta de la recámara correspondiente, proceso que hace que el vacío se pierda, lo que obliga a someter el MET al correspondiente proceso de vacío por varias horas (alrededor de 15).

Para obtener una buena imagen hay que tener en cuenta que su enfoque puede sufrir alteraciones significativas con cambios en la posición de la muestra. Para corregir este inconveniente es necesario previamente manipular los componentes (brazo portamuestras, lente objetivo y condiciones de brillo y contraste) buscando primero que la muestra quede fija con el haz alineado en la zona de interés, y segundo,

buscando una buena relación iluminación-contraste, ambas condiciones son clave para la adquisición de una buena imagen.

Luego de tener la imagen impresa en el negativo, este se lleva consecutivamente a un fijador, un revelador y luego es lavada con agua. En el pasado la micrografía se obtenía en papel fotográfico, lo que se hacía en un laboratorio fotográfico comercial, dando como consecuencia que en repetidas ocasiones las fotos sufrieran daños, además de involucrar gastos extras. En la actualidad la unidad de microscopía cuenta con un escáner de negativos.

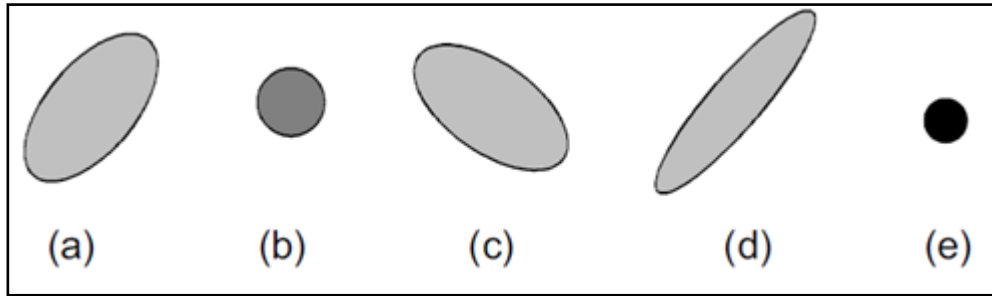
#### **4.2. Funcionamiento y calibración.**

El MET JEOL JEM 1200EX ha estado a cargo de la especialista en microscopía Patricia Mosquera, con un protocolo adecuado tanto a los requerimientos de la instrumentación como de las necesidades de los usuarios. Esto ha permitido que el instrumento haya estado sometido a un mínimo desgaste, alargando su vida útil.

Luego de realizar actividades de mantenimiento del MET es posible que el instrumento requiera pasar por un proceso de calibración en el que se alinea el haz de electrones con el eje óptico y se tratan de minimizar el efecto de las aberraciones en el sistema óptico.

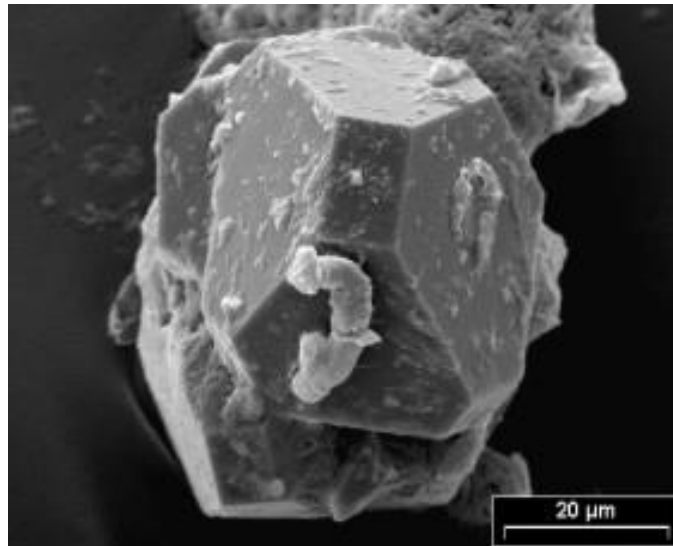
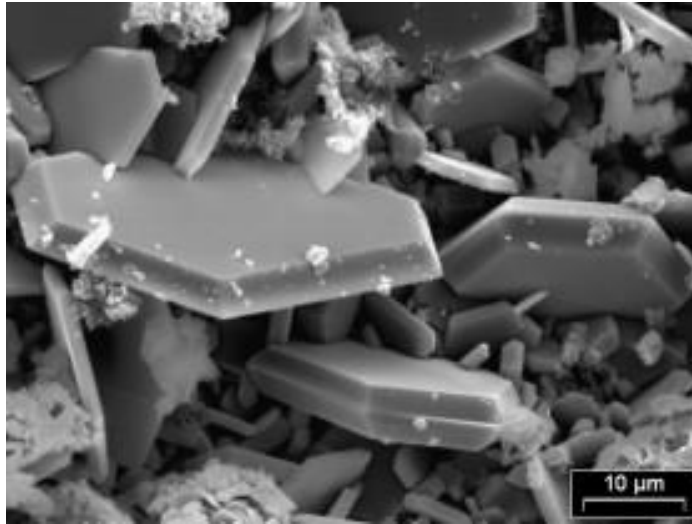
##### **✓ Calibración**

Posterior al cambio de filamento es necesario re-alinear el haz de electrones para corregir los defectos que se puedan presentar en las lentes. Como primer paso se genera la iluminación y se observa en la pantalla el punto de iluminación que, de no requerirse la calibración, debe verse como se presenta en la figura 4.2e. Si lo que se observa en la pantalla es una imagen diferente (figura 4.2a-4.2c), se requiere de correcciones en las lentes. Para ello se manipulan los potenciómetros encargados de regular las corrientes eléctricas en las lentes hasta llevar la iluminación a las condiciones de formación de la imagen del punto. En el anexo A1 se presentan los detalles del proceso de alineación.



**Figura 4.2.** Iluminación en la pantalla de fosforo del MET (a)Desenfocada, (b)Completamente enfocada, (c)Sobre enfocada. También se muestra el efecto de astigmador del condensador (d)Problema de orientación (e) orientación y foco corregidos, (note que el punto con las correcciones es más pequeño que sin la corrección del astigmatismo).





# **CAPÍTULO V:**

## **OTROS MICROSCOPIOS**

Durante el desarrollo de la pasantía se visitaron algunos laboratorios de microscopía electrónica de las que se obtuvo información técnica sobre los equipos disponibles en otros centros de investigación del país, así como detalles de sus prácticas para preparar las muestras y de las aplicaciones que actualmente se les da a estos equipos.

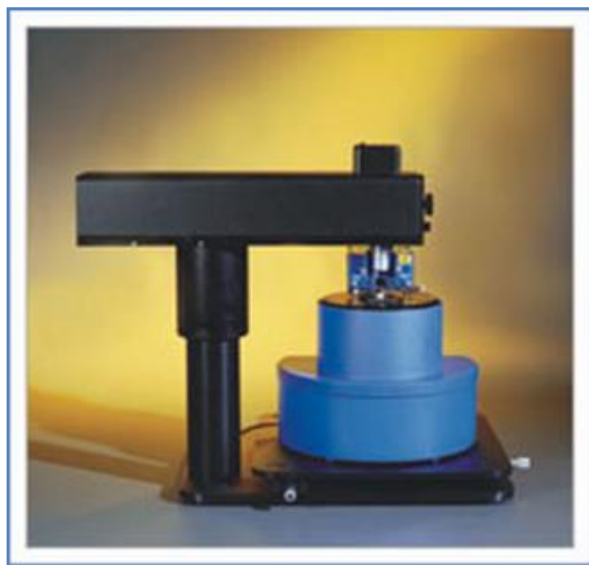
A continuación se presenta la información obtenida a partir de las visitas al Laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional sede Manizales, al Laboratorio de Microscopía Avanzada de la Universidad Nacional sede Medellín, y al laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional, sede Palmira.

### **5.1. Microscopio de barrido por Sonda, Laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional, sede Manizales**

La figura 5.1. presenta una fotografía del edificio de laboratorio del plasma de la Universidad Nacional, sede Manizales. Este laboratorio cuenta con un microscopio de barrido por sonda similar al que se describe en la sección 1.4. El microscopio electrónico de barrido por sonda es un instrumento que tiene una resolución comparable a la del MET. El laboratorio lo utiliza especialmente en la caracterización morfológica de superficies. Gracias a la manipulación mecánica precisa de una sonda de diámetro del orden de las micras, es posible hacer un rastreo (barrido) que brinda un análisis detallado de un área seleccionada de la muestra. El tipo de análisis dependerá del tipo de sonda instalada, lo que ofrece la posibilidad de medir propiedades físicas locales de la muestra, tales como campos magnéticos, módulos de elasticidad, dureza y distribución de carga. En la figura 5.2 se muestra una imagen de este microscopio.



**Figura 5.1** Laboratorio de Física del Plasma.



**Figura 5.2** Microscopio de Barrido por sonda del laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional sede Manizales

A pesar de las diferencias, tanto en instrumentación como en funcionalidad entre los microscopios electrónicos de transmisión y los de barrido por sonda, su poder de resolución es comparable, de hecho la primera imagen obtenida de átomos individuales fue obtenida con un microscopio de barrido por sonda. Hay que tener en cuenta que, debido a que este tipo de microscopios tienen la posibilidad de adaptar el tipo de sonda requerido, su resolución está determinada por el diámetro de la punta instalada, siendo que los equipos modernos cuentan con puntas que pueden llegar a ser nanotubos de carbono. La información que se extraiga de la muestra depende de las propiedades específicas de la sonda, que puede ser sensible mecánica, eléctrica, o magnéticamente, lo que convierte a este microscopio en una herramienta complementaria al análisis morfológico obtenido con el microscopio de transmisión.

## **5.2. Microscopio Electrónico de Barrido, Laboratorio de Microscopía de la Universidad Nacional sede Medellín**

El laboratorio de Microscopia Avanzada de la Universidad Nacional sede en Medellín tiene a su disposición un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5910 LV, con detectores BES(detector de electrones secundarios) y SEI para la formación de imágenes y detectores EDS y WDS para análisis químico cuantitativo y cualitativo de muestras conductoras y no conductoras. La figura 5.3 muestra el SEM. Una de las ventajas que ofrece este equipo es que trabaja con un vacío menor al del MET, lo que permite un gasto menor de tiempo y energía en generar el vacío de trabajo, en comparación con el MET al que le toma alrededor de 50 minutos alcanzar el vacío de

trabajo el JSM 59 LV tarda solo 10 minutos en esta tarea, a partir de este tiempo el operario puede usar el instrumento usando voltajes de aceleración de hasta 30 kV alcanzando aumentos de hasta 300.000X.



**Figura 5.3.** Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5910 LV del laboratorio de microscopia avanzada de la Universidad Nacional sede Medellín

El diámetro mínimo del haz en un microscopio de este tipo oscila entre 10 y 20  $\mu\text{m}$ , lo que significa una resolución menor a la del MET (aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ ), sin embargo es útil en el estudio detallado de la microestructura superficial y en la caracterización y determinación de componentes químicos presentes en la muestra, para lo cual hace uso de un detector de rayos X que indica la composición química local de la muestra. En la figura 5.4 se muestra una fotografía de la recámara donde se ubica la muestra en este equipo, además de algunos portamuestras utilizados en el mismo.



**Figura 5.4.** (a) Recámara del portamuestras del Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5910, (b) Portamuestras usadas para este SEM

Puesto que en el MET, la muestra que está siendo observada tiene varias formas de respuesta al estímulo de la iluminación, como por ejemplo la emisión de rayos X característicos, existen aditamentos disponibles en el mercado que permitirían equiparlo con una mayor cantidad de sensores, aumentando su funcionalidad y potenciando su uso, de hecho, algunos microscopios modernos brindan la posibilidad de ser operados como instrumentos multifuncionales MET, SEM, STEM, además de incorporar sensores para varios tipos de señal que extraen información simultánea de la muestra.

### **5.3. Microscopio Electrónico de transmisión Laboratorio de Microscopía de la Universidad Nacional, sede Palmira.**

La unidad de microscopía electrónica de la Universidad Nacional sede Palmira está equipada con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1011, similar al de la Universidad del Cauca (ver figura 5.5.), aunque más moderno ya que el MET de la Unal de Palmira posee un sistema automático de adquisición de imágenes digitales y la capacidad de albergar en memoria gran número de estas imágenes sin mayor gasto de recursos lo que permite realizar ensayos para sacar más provecho de los resultados obtenidos. El moderno diseño de este instrumento se traduce en una mayor facilidad de operación con respecto a diseños anteriores y una reducción considerable de los defectos “ópticos” tipo aberraciones, gracias a que tiene un mayor control sobre las condiciones de trabajo de las lentes electromagnéticas; además permite una calibración menos complicada y tiene automatizadas algunas funciones (como la toma de imágenes) y guarda en su memoria interna información sobre coordenadas de un punto específico de la muestra.



**Figura 5.5.** Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM 1011

La Unidad de Microscopía electrónica de la Unal sede Palmira ofrece servicios a los grupos de investigación en otras universidades y a instituciones de salud e investigación ambiental. Cuando se requiere una resolución mayor en el estudio de las muestras son enviadas a la unidad de microscopia de la Unicauca, ya que las imágenes analógicas obtenidas con la impresión de películas fotográficas pueden revelar detalles que las imágenes digitales no. Mientras el valor del voltaje de aceleración en este equipo puede llegar hasta los 110 kV el MET con el que cuenta Unicauca llega hasta los 120 kV, lo que significa una mayor resolución (valor menor de límite de resolución).



# Conclusiones y Recomendaciones

La pasantía que dio como resultado el presente documento fue realizada durante el año 2013 en la unidad de microscopía de la Universidad del Cauca, bajo la asesoría del Ingeniero electrónico, Jaime Díaz, quien se encargó el mantenimiento del microscopio durante más de veinte años y de la especialista Patricia Mosquera, actual coordinadora de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca.

A continuación se exponen conclusiones que surgieron durante el tiempo de la pasantía, basadas tanto en lo aprendido con el estudio de la naturaleza de la técnica como con la experiencia práctica adquirida durante el tiempo de trabajo con el MET.

- ✓ El microscopio electrónico de transmisión JEOL, JEM 1200-EX, de la Unidad de Microscopía de la Universidad del Cauca, sigue siendo un instrumento de invaluable utilidad en el proceso de caracterización morfológica de materiales y en la detección de alteraciones en la morfología de células de tejidos biológicos, principales campos de acción en los que ha sido explotado su uso durante sus 22 años de servicios.
- ✓ A pesar de la antigüedad de su fabricación sigue siendo un instrumento robusto y comparable con sus similares más modernos, en especial en lo que se refiere a su poder de resolución.
- ✓ Muchos de los daños sufridos por el MET han sido de tipo degenerativo, por citar un ejemplo, procesos de corrosión que al inicio pueden no representar inconvenientes para el uso, con el tiempo adquieren un carácter de daño irreparable que podría haber sido evitado con un mantenimiento preventivo.
- ✓ La instrumentación especializada requiere de constante supervisión por personal capacitado. Esto no sólo aumenta la vida útil del instrumento sino que permite potenciar su funcionalidad.
- ✓ Una de las razones por las que los equipos y centros de investigación en la región son subutilizados es el desconocimiento de otras entidades sobre las capacidades de dichos centros, por lo que se recomienda hacer una divulgación a la comunidad del impacto del MET en los diferentes campos de investigación.



## REFERENCIAS

- [1] Eugene Hetch, *Optics*, 2° ed. Editorial, BENJAMIN CUMMINGS PUBLISHING CO, 2002
- [2] Physical Principles of Electron Microscopy, An Introduction to TEM, SEM, and AEM; Ray F. Egerton, Department of Physics, University of Alberta. 2005
- [3] History of the light microscope,{en linea}{Consultado 20-12-2013} disponible en <http://www.history-of-the-microscope.org/history-of-the-microscope-who-invented-the-microscope.php>
- [4] Registro fotográfico de la PBS,{en linea}{Consultado 12-12-2013} disponible en [http://www.pbs.org/eakins/img\\_1900.htm](http://www.pbs.org/eakins/img_1900.htm)
- [5] High Energy Electron Diffraction and Microscopy, L.-M. Peng,S. L. Dudarev,M. J. Whelan
- [6] Advances in Imaging and Electron Physics, Peter W. Hawkes, Pag.532
- [7] Manual de instrucciones Jeol, Jem 1200 EX(figura 2.1)

## BIBLIOGRAFIA

*Highresolution transmission electron microscopy and associated techniques*,Buseck, Peter ;Oxford University Pres. (1992).

*THE PRINCIPLES OF TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY IMAGE FORMATION*, - PiotrDłużewski, Institute of Physics Polish Academy of Sciences, Al. Lotników 32/46, 02668 Warsaw, Poland, 2004

*THE OPERATION AND CALIBRATION OF THE ELECTRON MICROSCOPE*; J.W. Philips tecnicallibraryEditngton, department of metallurgy and materials Science, University of Cambrige.1974

*Introducción a la microscopia electrónica aplicada a las ciencias biológicas*; Gerardo VasquezNin, OlgaEcheverría, facultad de ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. 2000.

*TEORIA BASICA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION*, José EdgarAlfonza y Dery Esmeralda Corredor, Editorial Universidad nacional de colombia.2010

*HANDBOOK OF MICROSCOPY FOR NANOTECHNOLOGY*, Nan Yao, Princeton University, Princeton, NJ, USA;ZHONG LIN WANG Georgia Institute of TechnologyAtlanta, GA, USA.

## **ApéndiceA1 : Trabajos Futuros**

- ✓ La implementación de sistemas automáticos de monitoreo de condiciones de trabajo, ya que la información entregada por los sensores y medidores en el MET pueden ser de gran utilidad para detectar inconsistencias en el funcionamiento. Así pueden implementarse en el equipo instrumentos que generen alarmas en caso de cambios considerables en las condiciones normales de trabajo del MET.
  
- ✓ Implementación de un sistema integrado de adquisición de imágenes: La implementación de un sistema de adquisición y procesamiento de imágenes es posible y se traduciría en un ahorro de recursos y tiempo durante el trabajo a realizar además de garantizar una mejora en los resultados obtenidos.
  
- ✓ Implementación de detectores y sensores que existen en el mercado y que ampliarían el uso del MET, ya que existe información que se extrae de la muestra que no se está aprovechando y que puede brindar información sobre su composición química.
  
- ✓ Dentro de las capacidades del MET está la de extraer patrones de difracción de muestras cristalinas con los que se puede concluir parámetros cristalográficos de dicha muestra, lo cual puede significar de gran ayuda en el estudio de materiales en los trabajos del programa de ingeniería física.

## **Apéndice A2: Presentación en eventos**

Durante el tiempo de la pasantía se participó en el XII Congreso Interamericano de Microscopía Electrónica celebrado en la ciudad de Cartagena entre el 24 y el 29 de septiembre de 2013, con el trabajo titulado “Física e Ingeniería en la Microscopía Electrónica de Transmisión Aplicada al JEOL JEM 1200”. El resumen presentado fue el siguiente.

### **Física e Ingeniería en la Microscopía Electrónica de Transmisión Aplicada al JEOL JEM 1200**

#### **NUMERO / CATEGORIA DEL RESUMEN**

**PI - 012 / Microscopia Iónica y Electrónica**

El aprovechamiento de la instrumentación de la que dispone un investigador, es mayor cuanto mayor sea su conocimiento de los principios físicos en los que se basa su funcionamiento y construcción, así que es indispensable contar con apoyo bibliográfico en el que se registren tales detalles. El resultado del presente trabajo es la documentación mencionada. La propuesta, es elaborada en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad Del Cauca y para su desarrollo se realizan actividades de campo, discusiones con los expertos en el mantenimiento y la operación del MET, así como seminarios continuos para la discusión de los resultados con la directora del trabajo. Sistematización de información concerniente a los principios físicos y la ingeniería involucrada en el funcionamiento del MET.