

torio de cerámica y materiales de Vitro Tec.

Nuestros agradecimientos para los Ings. Benito Becerril y Sacarías Pinal y al Dr. Abraham Velasco por su valiosa asesoría y especialmente al Lic. Jorge Loredo Murphy, Gerente de Cerámica y Materiales de Vitro Tec por las facilidades proporcionadas.

También queremos agradecer la valiosa colaboración del Sr. Pedro Rocha Ramírez por su trabajo en las ilustraciones y a la Srita. Ma. Magdalena Camarena Benavides por su eficiente contribución en la mecanografía de este texto.

II. SIPNOSIS HISTORICA

La microscopía es la ciencia que se ocupa de la observación, examen y estudio de objetos muy pequeños con la ayuda del microscopio. Nace para nosotros el 9 de Octubre de 1676, fecha en la que un comerciante holandés de la localidad de Delft, envía la primera comunicación científica de que se tenga memoria, donde da a conocer a la Royal Society de Londres, Inglaterra, sus observaciones de "animalículos" obtenidos de agua de charcas y de su propia boca, Anton Van Leeuwenhoeck fué el nombre de este holandés que consideramos el padre de la microscopía.

Posteriormente, con la participación de personas con mayor conocimiento científico y tecnológico aparecieron aparatos más avanzados; el alemán Ernst Abbe, que trabajaba a la sazón asociado con Carl Zeiss demostró matemáticamente que el perfeccionamiento del microscopio óptico (Fótico o de luz) no podría continuar en forma indefinida y que el poder máximo de resolución susceptible de alcanzar era aproximadamente de la mitad de la longitud de onda de la luz empleada (5,000 Å). Este valor corresponde aproximadamente a los 250 nm (0.25 µm) por lo que una observación en uno de estos aparatos el ojo humano difícilmente recibe informaciones mayores a los 1,500 aumentos, independientemente de la calidad del instrumento.

Con el descubrimiento del electrón a finales del siglo XIX, por el inglés J.J. Thomson, se abrió un capítulo importante en la historia de la microscopía. Este científico demostró que los rayos emitidos por el cátodo de electrodos están formados de partículas cargadas negativamente. Estas partículas sirvieron a Louis de Broglie para presentar su tesis doctoral en 1924, demostrando que en la materia los electrones, al igual que los fotones en la luz, presentan propiedades

de onda y de partícula.

Dos años más tarde, en 1926, Bush mostró que las radiaciones eléctricas podían ser enfocadas por medio de campos magnéticos con simetría axial y que estos funcionaban como lentes. En 1927 Gabor construye la primera lente electrónica consistente en un selenoide de hierro dulce. Con estos conocimientos en el año de 1931, dos científicos alemanes, E. Ruska y M. Knoll lograron construir el primer microscopio electrónico, muy rudimentario, pues su poder de resolución era menor al del microscopio óptico de aquella época. En 1934, E. Briest y H.O. Muller modifican el microscopio de Ruska y logran sobrepasar el poder de resolución del microscopio fotónico.

Microscopio Electrónico de Transmisión

Era tan limitada la amplificación y tan pobre el poder de resolución de los primeros microscopios electrónicos, que poca o nula importancia se les dió en el campo de la investigación. Fué Krauze, en 1936, quien aplicó las técnicas básicas de preparación de diferentes materiales que fueron motivo de las primeras observaciones al microscopio electrónico. Este microscopio ha sido llamado de transmisión, ya que el haz de electrones atraviesa una fina membrana o preparación para proyectar la imagen sobre una pantalla fluorescente colocada al final de la trayectoria de este flujo de electrones que requiere de un espacio con vacío para desplazarse a través del sistema de lentes electromagnéticas.

La emisión del haz tiene su origen en un filamento de tungsteno en forma de horquilla que se encuentra rodeado por una pantalla cilíndrica o cilindro de Whentel que está polarizada negativamente con respecto al filamento. Como consecuencia de esta polarización negativa, el campo alrededor

de la apertura circular actúa como una lente electrostática que produce una imagen de pequeño diámetro en un punto situado debajo de la pantalla cilíndrica antes mencionada. A esta imagen se le conoce como entrecruzamiento.

El filamento de tungsteno o cátodo, generalmente posee una tensión de 50,000 a 60,000 voltios. Gracias al alto voltaje y al vacío en que se conducen los electrones emitidos la longitud de onda del rayo electrónico es tan corta como 0.05 nm, permitiendo un poder de resolución cercano a 1.0 nm. El cañón electrónico es el sistema óptico, consta generalmente de una lente condensadora, una lente del objetivo, una lente intermedia y una lente proyectiva.

Cada una de las lentes, menos la proyectiva, posee un diafragma que en la primera instancia sirve para evitar la dispersión de los haces luminosos cuando se desplaza en el vacío. Siendo necesario para este propósito que exista un perfecto centrado del sistema óptico que garantice que el haz de electrones lo atravesase en sentido axial. Así mismo este dispositivo sirve para ajustar la luminosidad que se requiere para suministrar determinada carga a los especímenes estudiados. La luminosidad depende directamente del diámetro del diafragma y la localización de éste dentro de la columna. Las observaciones se realizan sobre la pantalla fluorescente colocada en la parte inferior de la columna, la cual se encuentra recubierta con un material que nos permite la visión del objeto a analizar tal como si fuera una sombra reflejada sobre una superficie. Inmediatamente abajo de esta pantalla se encuentra una placa fotográfica donde se registra la imagen para su posterior revelado, impresión e interpretación. En la práctica la obtención de excelentes fotografías es de gran valor para el investigador. La calidad de estas fotografías dependerá del estado que guarda

el sistema óptico formador de la imagen, de la naturaleza de la muestra y del cuidado con que se realiza el procesamiento de la misma antes de fotografiarla.

A la fecha, múltiples y variados son los procedimientos desarrollados por los científicos para hacer posible la observación de material biológico al microscopio electrónico de transmisión. Así se proporcionan imágenes bidimensionales de tejidos vegetales o animales mediante la técnica de cortes ultrafinos, o bien de virus, bacterias o bacteriófagos, aplicando la técnica del sombreado metálico o la tinción negativa, logrando de esta manera aumentar la calidad de la visión gracias a su capacidad de amplificación y a su poder de resolución.

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO

Mediante el empleo de cortes ultrafinos el microscopio electrónico de transmisión ha proporcionado a los investigadores una imagen bidimensional del interior de las células, tejidos y órganos. Con la aplicación de técnicas como la replicación, el recubrimiento metálico y/o la tinción negativa, es posible observar objetos de considerable volumen con la consiguiente pérdida de amplificación y resolución, agregándole los riesgos de contaminación para el sistema óptico. En la actualidad, estas limitaciones han quedado resueltas con el empleo del microscopio electrónico de barrido (MEB), el cual a pesar de su corta existencia ha demostrado sus beneficios gracias a su capacidad de resolución y a la profundidad de foco que proporciona al observador.

Los aspectos teóricos del MEB datan de 1930 y los primeros prototipos aparecieron en 1940 a 1950;

sin embargo, el primer MEB se ofreció a la venta en 1965. Los primeros aparatos carecían de profundidad de foco, el microscopio de luz y un poder de resolución cercano a los 25 nm. Afortunadamente en los últimos 20 años el avance tecnológico ha permitido que la resolución de un MEB alcance rangos de 5-7 nm y las amplificaciones rebasen los 100,000 aumentos, además, la emisión de otras radiaciones, como los rayos X, permiten extender su empleo para reconocer la composición elemental de una muestra y la distribución de los elementos dentro de la misma.

En primera instancia el MEB funciona como un circuito cerrado de televisión, donde un rayo electrónico generado por un filamento de tungsteno situado en la parte superior de la columna es excitado al momento de la observación por una corriente de alto voltaje. La columna se mantiene bajo un vacío aproximado de 10^{-5} Torr permitiendo que el haz de electrones se desplace libremente a través de una serie de lentes electromagnéticas, reduciendo progresivamente el diámetro del haz incidente hasta un diámetro de 5.0 nm o menos. Este haz de electrones impacta sobre la superficie de la muestra con un patrón de rastreo en líneas paralelas íntimamente espaciadas causando una excitación de electrones secundarios sobre la muestra. El número de electrones secundarios emitidos depende de la topografía de la superficie de la muestra, de su composición y de los cuidados observados durante el procesamiento. Generalmente, para muestras biológicas es obligado aplicar un recubrimiento metálico, sobre todo a aquellos especímenes que no son buenos conductores o emiten pocos electrones secundarios. Estos electrones secundarios pasan al colector que los acelera y hace que choquen con el escintilador. Aquí se producen fotones que entran y atraviesan un multiplicador lo cual sirve para producir gran número de electrones adicionales. Del fotomultiplicador pa

COMPARACION DEL MICROSCOPIO FOTICO (MF), MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (MEB)
Y MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION (MET)

ELEMENTOS	M.F.	M.E.T.	M.E.B.
ILUMINACION	RAYOS DE LUZ VISIBLE = 390-780 nm	RAYO ELECTRONICO = 0.005 nm	RAYO ELECTRONICO = 0.008 nm
MEDIO DE DESPLAZAMIENTO	ATMOSFERA	VACIO	VACIO
RANGO DE AMPLIFICACION	DE 10x a 2,000x	DE 200x a 200,000x	DE 20x a 100,000x
LENTESES	OPTICOS	ELECTROMAGNETICOS	ELECTROMAGNETICOS
RESOLUCION	REGION VISIBLE 250 nm REGION ULTRAVIOLETA 10-390 nm	0.2 a 1.0 nm	5 a 10 nm
ENFOQUE	MECANICO	ELECTRICO	ELECTRICO
IMAGENES OBTENIDAS	REFLEJADAS Y TRANSMITIDAS	TRANSMITIDAS	ELECTROSECUNDARIAS ELECTRODISPERSADAS
MONITOR	OBSERVACION DIRECTA	PANTALLA FLUORESCENTE	TUBO DE RAYOS CATODICOS (TRC)

sa cierto número de electrones a los rayos catódicos de imagen y registro (TRC), donde se hace la observación.

La forma de funcionamiento de emisión antes descrita es la más importante y más ampliamente utilizada para estudiar en tercera dimensión las muestras biológicas. Cuando se requieren análisis cuantitativos de los especímenes se puede aplicar otro tipo de radiaciones, como los rayos X, que se realiza añadiéndole espectrómetros de difracción de cristal, los espectrómetros dispersores de energía son útiles para análisis cualitativos y a veces también para cuantitativos.

Otras formas de funcionamiento del MEB es por reflexión, por luminiscencia, por conducción y por absorción.